

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE DERIVADOS TIOFÊNICOS E
TRIAZÓLICOS E *IN VIVO* DE FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS CONTENDO
TRIAZOL FRENTE ISOLADOS DE *CANDIDA* CARACTERIZADOS POR
MALDI-TOF ICMS**

**RECIFE
2011**

REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE DERIVADOS TIOFÊNICOS E
TRIAZÓLICOS E *IN VIVO* DE FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS CONTENDO
TRIAZOL FRENTE ISOLADOS DE *CANDIDA* CARACTERIZADOS POR
MALDI-TOF ICMS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração Micologia Aplicada, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

**RECIFE
2011**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de

Atividade antifúngica *in vitro* e derivados tiofênicos e triazólicos e *in vivo* de formulações lipossomais contendo triazol frente isolados de *Candida* caracterizados por MALDI-TOF ICMS / Recife: O Autor, 2011.

161 folhas: fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, Recife, 2011.

Inclui referências e apêndices

- 1. Candida 2. Triazóis 3. Candidíase I. Neves, Rejane
Pereira (orient.) II. Magalhães, Nereide Stela Santos (coorient.)
III. Título**

579.55

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 511

REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE DERIVADOS TIOFÊNICOS E
TRIAZÓLICOS E *IN VIVO* DE FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS CONTENDO
TRIAZOL FRENTE ISOLADOS DE *CANDIDA* CARACTERIZADOS POR
MALDI-TOF ICMS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos, Área de Concentração
Micologia Aplicada, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Data da defesa: 17/02/2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Rejane Pereira Neves (Orientadora) (Universidade Federal de
Pernambuco)

Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Universidade Federal de Pernambuco)

Dr. Francisco Jaime Mendonça Bezerra Júnior (Universidade Estadual da
Paraíba)

Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima (Universidade do Minho-Portugal)

Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Universidade Federal do Ceará)

“Dedico este trabalho ao meu querido avô, Reginaldo Gonçalves de Lima (in memoriam), o qual me ensinou que o caminho percorrido é mais belo e enriquecedor que o objetivo final.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me fazer forte diante de todos os percalços encontrados nessa árdua caminhada.

A minha mãe Riedja Filgueiras e minha avó Ruth Filgueiras que são as mais fiéis incentivadoras e batalhadoras para a minha formação e a quem eu tanto amo.

A minha Orientadora Professora Rejane Pereira Neves pelos ensinamentos, pela orientação peculiar, pela compreensão, pela... – afinal – por tudo que contribuiu grandiosamente para meu amadurecimento profissional.

A Jacqueline Lelem Queiroz que me acompanhou com especial dedicação nesses últimos anos, contribuindo de maneira imensurável para a conclusão desse trabalho, além de compreender os momentos difíceis por qual temos que passar em busca de um ideal.

Aos Professores Almir Wanderley, Francisco Jaime Bezerra Junior, Janaína Versiani Anjos, Nelson Lima e Nereide Santos Magalhães que contribuirão de forma singular para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos Professores Armando Lacerda, Lusinete Queiroz (*in memoriam*) e Oliane Magalhães, que me transmitiram com bastante entusiasmo seus enormes conhecimentos.

Aos Professores Rossana de Aguiar Cordeiro e Cledir Santos pelo acolhimento e presteza em meus estágios no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM/Universidade Federal do Ceará) e na Micoteca da Universidade do Minho (Centro de Engenharia Biológica/Universidade do Minho/Portugal), respectivamente.

Aos inúmeros amigos que graças a Deus conquistei durante esse trajeto, em minha turma de doutorado, no Departamento de Micologia, no Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, em minha terra natal (Caruaru) e na terra em que vivo há anos (Recife). Agradeço-lhes pelos dias de aprendizado e momentos de descontração que todos vocês me proporcionaram.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos por prezar pela excelência acadêmica nos proporcionando um curso com qualidade e de notório reconhecimento.

RESUMO GERAL

Atualmente, resistência e toxicidade dos agentes terapêuticos contra infecções por *Candida* são consideradas problema de saúde pública. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* (*Clinical Laboratory Standard Institute*) de 15 derivados tiofênicos e 10 derivados triazólicos e *in vivo* de uma formulação lipossomal, contendo um composto escolhido através do *screen*, frente a 42 isolados clínicos de *Candida* (20 *C. albicans*, cinco *C. krusei*, doze *C. parapsilosis* e cinco *C. tropicalis*) caracterizados pela nova técnica espectral MALDI-TOF ICMS. A maioria dos derivados de tiofeno apresentou moderada ou fraca atividade antifúngica com alta Concentração Inibitória Mínima (CIM). A ciclohexila nitro substituída foi a mais ativa com CIM entre 100-800 µg/mL, demonstrando que um anel de cicloalquil ligado ao anel tiofeno é essencial para atividade antifúngica. Entre os triazólicos, quatro não apresentaram ação antifúngica e cinco exibiram fraca atividade; entretanto, o triazol cloro substituído foi eficiente alcançando CIM entre 64-256 µg/mL. Este triazol foi então selecionado, encapsulado em vesículas lipossomais e avaliado *in vitro* frente aos mesmos 42 isolados, e *in vivo* contra *C. albicans* URM3719, naturalmente resistente ao fluconazol, através de um modelo experimental de candidíase com animais neutropênicos. Segundo parâmetros físico-químicos, a nanoformulação apresentou-se estável, com teor de fármaco acima de 95% e taxa de encapsulação de 82%. Além disso, a densidade eletrônica negativa conferiu afinidade e especificidade à levedura, explicando o maior tempo de sobrevivência dos animais tratados pela formulação, quando comparados ao fluconazol ($P < 0.05$). A identificação espectral dos isolados utilizados pelo MALDI-TOF ICMS evidenciou 27% de discordância em relação a identificação fenotípica clássica. Entretanto análises moleculares através de PCR *fingerprinting* ratificou as identificações espectrais nos isolados incoerentes. Os resultados sugerem que derivados de tiofeno e de triazóis são promissores como alternativas antifúngicas e formulações lipossomais garantem maior seletividade e menor toxicidade ao fármaco. Além disso, concluímos que a técnica de MALDI-TOF ICMS se mostrou capaz de distinguir espécies de *Candida* fortemente relacionadas de forma rápida e reprodutível, porém existe a necessidade de otimizar a diversidade microbiológica em um maior banco de dados para uma identificação mais fidedigna possível.

Palavras-chave: *Candida* spp. Tiofeno. Triazóis. Atividade antifúngica. Candidíase experimental. MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

Currently resistance and toxicity of therapeutic agents against *Candida* infections are considered public health problem. In this sense, this work aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity (Clinical Laboratory Standard Institute) of fifteen thiophene and ten triazoles derivatives and *in vivo* of screened compound-loaded liposomes against 42 *Candida* clinical isolates (20 *C. albicans*, five *C. krusei*, twelve *C. parapsilosis* and five *C. tropicalis*) identified by new spectral method (MALDI-TOF ICMS). Most thiophene derivatives exhibited moderate or weak antifungal activity with high Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The nitro substituted cyclohexyl was the most active with MIC values between 100-800 µg/mL, demonstrating that a cycloalkyl ring attached to the thiophene ring is essential for antifungal activity. Among the evaluated triazoles, four showed no antifungal effect and five exhibited weak activity, however the chlorine substituted triazole was efficient hitting MICs between 64-256 µg/mL. This triazole was then screened, encapsulated in liposomal vesicles and assessed *in vitro* against same 42 clinical isolates and *in vivo* against *C. albicans* URM3719, naturally resistant to fluconazole, by candidiasis murine model using neutropenic animals. According to physicochemical parameters, the nanoformulation remained stable, with drug content above 95% and encapsulation efficiency of 82%. Moreover, the negative electron density conferred affinity and specificity to the pathogenic yeast, explaining the longer survival of animals treated by the new formulation, when compared to fluconazole ($P < 0,05$). The spectral identification by MALDI-TOF ICMS showed 27% disagreement in relation to the classical phenotypic identification. However molecular analysis by PCR fingerprinting ratified the spectral identifications in inconsistent isolated. The results suggest that some thiophene and triazole derivatives are promising alternatives as antifungal drugs and liposomal formulations ensure greater selectivity and lower toxicity to these compounds. Furthermore, we concluded that MALDI-TOF ICMS technique was capable to discriminate fast and reproducible related closely *Candida* species, but there is a need to optimize the microbial diversity storage in the database.

Key-words: *Candida* spp.. Thiophene derivative. Triazole derivative. Antifungal activity. Experimental candidiasis. MALDI-TOF MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 3	Pág.
Figura 1 - Reagentes e condições: (a) propionaldeído, Et ₃ N, DMSO, 0-20 °C; (b) ciclopentanona (ou ciclohexanona ou cicloheptanona), Et ₃ N, EtOH, rt; (c) ArCHO, ácido acético, EtOH, refluxo.	37
Capítulo 5	
Figura 1 - Estrutura do 2-[1-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol evidenciando o par de elétrons não-ligantes nos átomos N-2 e N-3 do núcleo triazólico.	62
Figura 2 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> do triazol encapsulado em lipossomas carregados negativamente (4 mg/mL) em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C. Resultados são uma média de três experimentos.	72
Figura 3 - Média da mortalidade acumulada em dias após imunossupressão dos cobaias infectados com <i>C. albicans</i> URM 3719. I, grupo apenas imunossuprimido; II, grupo imunossuprimido com posterior infecção; III, grupo imunossuprimido, infectado e tratado com fluconazol; IV, grupo imunossuprimido, infectado e tratado com TZL-Lipo. <i>P</i> < 0,01 em I <i>versus</i> II e <i>P</i> < 0,05 em I <i>versus</i> III, mas <i>P</i> > 0,05 em I <i>versus</i> IV.	73
Capítulo 6	
Figura 1 - Dendograma baseado nos espectros dos isolados analisados. Os retângulos em destaque referem-se aos isolados que apresentaram discrepância entre a identificação clássica e análise pelo MALDI-TOF ICMS. O dendograma mostra a identificação polifásica utilizada nesse estudo: taxonomias clássica, proteômica através do MALDI-TOF ICMS e sequenciamento de regiões ITS. <i>Trichophyton rubrum</i> foi utilizado como controle externo.	93

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo 3	
Tabela 1 - Características físico-químicos dos derivados de tiofenos 3a-g , 4a-h .	38
Tabela 2 - Atividade antifúngica dos compostos 4a-h , fluconazol e anfotericina B frente a 44 isolados clínicos de <i>Candida</i> .	38
Capítulo 4	
Tabela 1 - Isolados de <i>Candida</i> estudados.	56
Tabela 2 - Atividade antifúngica dos derivados triazólicos 4a-j e fluconazol contra os isolado: <i>Candida</i> estudado.	57
Capítulo 5	
Tabela 1 - Atividade antifúngica de um novo derivado triazólico encapsulado em lipossomas e fluconazol frente isolados clínicos de <i>Candida</i> .	70
Tabela 2 - Estudo de pré-formulação e características físico-químicas de derivado triazólico em lipossomas formuladas com cinco diferentes razões molares do fármaco:lipídio.	71
Capítulo 6	
Tabela 1 - Comparação entre os resultados da taxonomia clássica e nova identificação por espectrometria de massa dos 41 isolados clínicos de <i>Candida</i> estudados.	91
Tabela 2 - Atividade antifúngica da anfotericina B e fluconazol frente aos isolados de <i>Candida</i> analisados.	92

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TÉORICA	13
2.1 <i>CANDIDA</i> COMO AGENTE ETIOLÓGICO	13
2.2 TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS <i>IN VITRO</i>	15
2.3 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA	17
2.4 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	22
2.5 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	26
2.6 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	32
3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS 2-(AMINO-SUBSTITUÍDO)- 4,5-DIALQUIL-TIOFENO-3-CARBONITRILA	36
4 SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS CONTRA ESPÉCIAS DE <i>CANDIDA</i>	45
5 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE UM NOVO DERIVADO TRIAZÓLICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS FRENTE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>CANDIDA</i>	59
6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA CLÁSSICA <i>VERSUS</i> NOVA IDENTIFICAÇÃO ESPECTRAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>CANDIDA</i>	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8 CONCLUSÕES FINAIS	107
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

Na década de 30 do século XX, doenças no homem associadas às espécies de *Candida* eram raras, e a candidíase profunda praticamente desconhecida. Atualmente, a candidíase superficial está entre as infecções mais comuns de pele e mucosas, entretanto, tanto a superficial quanto a profunda se constitui um problema de saúde pública (Sidrim; Rocha, 2004).

O aumento das infecções por espécies de *Candida*, importantes agentes de micoses oportunistas, se deve ao avanço da tecnologia médica, através do emprego empírico de novos agentes antibacterianos, tratamento invasivo e agressivo do câncer, transplantes de órgãos, e fatores responsáveis pelo crescente número de pacientes imunodeprimidos, como a pandemia da aids. Várias espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* e outras são citadas como agentes etiológicos de candidíase (Lacaz *et al.*, 2002).

Para o acompanhamento das diferentes manifestações clínicas da candidíase, vários agentes antifúngicos têm sido formulados e avaliados nos últimos anos. Entre esses agentes, encontram-se os derivados triazólicos que possuem largo espectro de atividade, excelente penetração tissular e alta biodisponibilidade sistêmica, representando potencial de aplicabilidade na terapêutica das infecções fúngicas, em especial a candidíase (Klastersky, 2004; Pfaller *et al.*, 2004). Esses fármacos atuam inibindo o citocromo P-450, uma enzima mitocondrial responsável pela conversão do lanosterol em 14- α -dimetil lanosterol, na via biossintética do ergosterol o qual é um componente essencial da membrana celular fúngica, regulando a fluidez, integridade, proliferação e crescimento fúngico (Varanasi *et al.*, 2004).

Até a década de 70 haviam limitações quanto aos testes existentes para avaliar a sensibilidade de fungos a drogas antifúngicas, devido ao escasso conhecimento sobre infecções fúngicas, assim como disponibilidade dos agentes terapêuticos, associada a eficácia constante da anfotericina B, apesar de seus efeitos colaterais. Em virtude da preocupação com o aumento da sobrevida de pacientes com déficit do sistema imune, medidas para tratamento adequado nas micoses estão sendo adotadas (Hossain; Ghannoum, 2000; Pfaller *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da padronização de testes de susceptibilidade a antifúngicos, tem sido foco de intensas pesquisas nos últimos 15 anos e atualmente estão sendo disponibilizados métodos de referência (antifungigrama) para leveduras tornando os laboratórios aptos a predizer o sucesso da terapêutica instituída (CLSI, 2008).

No que se refere ao binômio fármacos-nanoterapia, os lipossomas, contribuem como modelos para elucidar o mecanismo de ação de várias drogas sobre as mais complexas membranas biológicas, assim como veicular medicamentos em locais determinados (Batista, 2007). A nanoterapia se destaca por ter o potencial de guiar fármacos direta e especificamente aos tecidos lesados, minimizando os efeitos adversos, encontrados na terapia convencional (Lira *et al.*, 2009).

No início do século XXI, não contamos na prática clínica com um arsenal antifúngico ideal. Os antimicóticos existentes formam um pequeno grupo de fármacos distribuídos entre poliênicos, azólicos e alilaminas, que constantemente, não atingem os resultados esperados. O aumento na disponibilidade de fármacos antifúngicos, assim como diferentes formulações, que as tornem mais efetivas e menos tóxicas, contribuirão para a melhor qualidade e sobrevida dos pacientes.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *CANDIDA* COMO AGENTE ETIOLÓGICO

Na prática médica, o estudo dos fungos, assumiu uma grande importância devido ao crescente aumento de pacientes imunossuprimidos. Essa categoria de fungos é representada principalmente por espécies de *Candida*, as leveduras mais comumente implicadas em casos de micoses oportunistas (Campisi *et al.*, 2004). Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem predominantemente por brotação e/ou fissão. Estão amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas do ar, homens, animais, alimentos, flores, insetos, solo, águas, entre outros (Barnett *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002).

Em 1839, Langenbeck descreve pela primeira vez um microrganismo, atualmente conhecido como *C. albicans*, considerada a mais importante levedura patogênica ao homem. Posteriormente, em 1842, Gruby descreveu a candidíase oral e classificou essa levedura no gênero *Sporotrichum*. Em 1853, Charles Robin denominou de *Oidium albicans* e Berkhout, 70 anos depois, denominou o gênero de *Candida* (Kreger-Van Rij, 1984).

Na década de 30, doenças no homem, associadas às espécies de *Candida*, eram raras, e a candidíase profunda praticamente desconhecida. Atualmente, a candidíase superficial está entre as infecções mais comuns de pele e mucosas, e, tanto a superficial quanto a profunda constitui um problema de saúde pública. Várias espécies do gênero como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, entre outras, são citadas como agentes etiológicos dos variados quadros clínicos de candidíase (Gupta *et al.*, 2001; Kovacicova *et al.*, 2001; Chapman, 2003; Hawkins; Baddour, 2003; Roilides *et al.*, 2004; Dorko *et al.*, 2005).

Espécies de *Candida* são os agentes etiológicos mais comuns nas infecções fúngicas humanas, ocasionando processos patológicos que promovem desordens mucocutâneas não-letais, a doença invasiva que pode envolver qualquer órgão e conduzir ao óbito (De Rosa *et al.*, 2009).

Dentre as dermatomicoses, a candidíase ocupa lugar de destaque na dermatologia clínica, sendo espécies de *Candida* o agente etiológico mais isolado em amostras clínicas de pele e unhas (Foster *et al.*, 2004; Watanabe *et al.* 2008). Candidíase vulvovaginal é

uma manifestação clínica oportunista que afeta aproximadamente 75% das mulheres, pelo menos uma vez em sua vida reprodutiva e até 10% destas, apresentam quadros recorrentes, definido como pelo menos quatro infecções ao ano (Liu *et al.*, 2006).

Candidíase invasiva, outro importante quadro clínico, apresenta impacto significativo na convalescência de pacientes, e estima-se que o índice de mortalidade por essa forma da candidíase atinja 47% dos casos (Gudlaudsson, 2003), embora muitas autoridades calculem a mortalidade atribuível em uma faixa de 15-25% para os adultos e 10-15% para neonatos e crianças (Morgan *et al.*, 2005; Zaoutis *et al.*, 2005). Durante as últimas décadas, os avanços na tecnologia destinados aos cuidados com o paciente, contribuíram para o aumento da taxa de mortalidade dos acometidos por essa micose (Pappas *et al.*, 2003; Fridkin, 2005). Os custos adicionais calculados para cada episódio de candidíase invasiva em pacientes hospitalizados é cerca de \$40.000,00 (Fridkin, 2005; Morgan *et al.*, 2005).

Candidemia ou candidíase hematogênica ocupa a quarta causa mais comum de infecção hospitalar no mundo (Richet *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004; Wisplinghoff *et al.*, 2004; Arendrup *et al.*, 2005). É geralmente uma infecção difícil de diagnosticar e possui uma taxa de mortalidade próxima a 40% (Pfaller *et al.*, 1998).

A Sociedade de Doenças Infecciosas da America advoga que a terapia antifúngica deve ser iniciada em todo paciente com candidíase hematogênica até 24 horas após se ter obtido a levedura proveniente da cultura a partir do sangue, uma vez que a terapia tardia esta associada com o aumento da mortalidade. Cultura de sangue seriada deve ser processada para assegurar a ausência de *Candida* da circulação sangüínea. Especialistas recomendam que o semeio de amostra sanguínea seja executado diariamente ou a cada dois dias até que não ocorra o desenvolvimento de nenhuma unidade formadora de colônia (Pappas *et al.*, 2003).

Os procedimentos terapêuticos invasivos, como cateterização urinária, intubação endotraqueal, ventilação mecânica e cateteres intravasculares são responsáveis pelo aumento do número de casos de infecções nosocomiais devido à quebra das defesas fisiológicas do indivíduo (Oliveira *et al.*, 2001). Associado a este fato, a tecnologia aplicada à assistência hospitalar, principalmente em unidade de tratamento intensivo (UTI), viabiliza o prolongamento da sobrevivência do paciente em situações muito adversas. Embora altamente positivo por um lado, por outro a longevidade do paciente aumenta o risco deste ser acometido por alguma infecção. Pacientes críticos possuem uma

permanência prolongada no ambiente hospitalar, sendo este, um dos fatores que favorece o desenvolvimento das micoses nosocomiais, as quais representam uma grave ameaça a esse grupo de pacientes (Abelson *et al.*, 2005).

Além da permanência hospitalar prolongada com seus procedimentos decorrentes, existem vários outros fatores de risco que predis põem casos de micoses oportunistas, destacando-se a realização de quimioterapia e radioterapia, ocorrências de episódios de neutropenia, terapia imunossupressora, antibioticoterapia de amplo espectro e/ou prolongada, portadores de doenças crônicas como diabetes, doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico, a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) e a realização de transplantes (Almirante *et al.*, 2006). Outros fatores predisponentes mais raros são o puerpério, insuficiência hepática, manipulação geniturinária e procedimentos neurocirúrgicos (Castro *et al.*, 2006).

Aproximadamente 35 a 65% das candidíases são causadas por espécies de *Candida* corriqueiramente chamadas não-albicans. Estas leveduras ocorrem mais frequentemente em pacientes com câncer, em UTI, que sofreram procedimentos cirúrgicos ou portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e sua proporção vem aumentando, e até a década de 90, representavam cerca de 10 a 40% desta levedurose. As espécies mais comumente isoladas são: *C. parapsilosis* (20-40%), *C. tropicalis* (10-30%), *C. krusei* (10-35%) e *C. glabrata* (5-40%). Embora essas sejam as quatro espécies mais comuns, pelo menos outras duas estão emergindo; *C. lusitaniae* (2-8%) e *C. guilliermondii* (1-5%). Mortalidade devido a essas espécies é similar a *C. albicans*, variando de 15 a 35% (Krcmery; Barnes, 2002).

Em pacientes hospitalizados onde a alta incidência de fungemia apresenta índices de mortalidade superior a 40%, justifica-se a importância da implantação de medidas preventivas para as infecções, como um rápido diagnóstico associado a um tratamento eficiente que passa pela determinação *in vitro* da sensibilidade do agente infeccioso (Wenzel; Pfaller, 1991).

2.2 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Até poucas décadas, os testes de sensibilidade aos antifúngicos não eram julgados necessários porque a maioria dos fungos, clinicamente importantes, demonstrava sensibilidade a anfotericina B. Entretanto, nos últimos anos, o uso de novas e mais

efetivas drogas antibacterianas e imunossupressoras, no tratamento do câncer, em transplantes de órgãos e a pandemia da aids entre outros, aumentaram a sobrevivência dos pacientes, com reflexos na maior permanência hospitalar e nas taxas de morbidade. Dessa forma, os pacientes se tornam mais susceptíveis às infecções fúngicas, e, portanto, exige-se cada vez mais que os laboratórios estejam aptos a prever o sucesso da terapêutica que será instituída (Colombo, 1994; Rex *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001; NCCLS, 2002; Pfaller, 2002).

Os testes de sensibilidade antifúngica para leveduras ainda requerem mais estudos, devido às divergências quanto ao uso de drogas, a diversidade dos organismos e as metodologias específicas (Rodrigues-Tudela *et al.*, 2002). Desde os anos 80, grupos norte-americanos e europeus estão envolvidos em desenvolver métodos de referência para testar a sensibilidade antifúngica, sendo o principal, o proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico) atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) (Pappalardo; Melhem, 2003).

Segundo Baddeley *et al.* (2004) a avaliação da sensibilidade de leveduras de *Candida* aos antifúngicos é de grande interesse considerando a alta frequência e as severas manifestações clínicas das infecções por estes fungos patógenos.

A emergente resistência e mudanças no perfil epidemiológico das espécies de *Candida* nas infecções têm levado a um maior interesse nos testes de sensibilidade a drogas antifúngicas (Perfect, 2004). Em 1997, o NCCLS apresentou a padronização do método de microdiluição em caldo. O teste realizado em placa de microtitulação apresentava a vantagem no baixo consumo dos reagentes e na possibilidade de se testar vários isolados ao mesmo tempo. Em 2002, foi publicado o documento M27-A2 pelo NCCLS que padronizava os testes por macro e microdiluição para testar a sensibilidade antifúngica *in vitro*. Estes testes diminuíram as variações das concentrações inibitórias mínimas (CIM) entre os laboratórios, e a melhora na reprodutibilidade permitiu uma comparação dos níveis de resistência entre regiões, além do monitoramento da emergência de isolados resistentes (Perfect; Cox, 1999; NCCLS, 2002; Pappalardo; Melhem, 2003). Intensos esforços contínuos, com objetivo de desenvolver um método padronizado, reprodutível e clinicamente relevante para testar a sensibilidade de

leveduras, resultaram na elaboração do documento M27-A3 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* adotado atualmente pela comunidade científica (CLSI, 2008).

Embora a sensibilidade de espécies de *Candida* para os agentes antifúngicos atualmente disponíveis sejam, de forma geral, previsíveis, principalmente se a espécie isolada e que está causando a infecção é conhecida, existem isolados com peculiaridades individuais que necessariamente não seguem este padrão geral. Desta forma, os testes que avaliam a sensibilidade vêm sendo cada vez mais usados para guiar o tratamento que será instituído, especialmente em situações que ocorre fracasso da terapia antifúngica adotada (Pfaller *et al.* 2006; CLSI, 2008).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

A resistência aos antifúngicos pode ser classificada de duas formas: resistência *in vitro* e *in vivo*. A resistência *in vitro* pode ser subdividida ainda em resistência *in vitro* primária, chamada também de intrínseca ou inata, que se apresenta naturalmente no microrganismo; e resistência *in vitro* secundária, que aparece quando o microrganismo inicialmente sensível se torna resistente (Sanglard; Odds, 2002; Vandeputte *et al.*, 2005).

A resistência *in vivo* aparece como resultado de falha do tratamento antifúngico e não se associa, necessariamente, com a diminuição da sensibilidade *in vitro*. Esse tipo de resistência pode ocorrer em virtude da farmacocinética da droga antifúngica, fatores dependentes do hospedeiro, como estado imune, doenças de base, entre outros, assim como fatores relacionados ao microrganismo, como virulência e resistência (Viudes *et al.*, 2002; Brion *et al.*, 2007).

Diversos são os relatos de isolados clínicos de *Candida*, resistentes *in vivo* e *in vitro*, a fármacos antifúngicos, principalmente a derivados azólicos, e dentre estes, ao fluconazol, sendo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* as mais citadas (Sanglard; Odds, 2002; Posteraro *et al.*, 2006). Recentemente, isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*, têm apresentado resistência *in vitro*, ao fluconazol, cetoconazol e itraconazol (Ozawa *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2007).

Resistência a fluconazol pode emergir na candidíase, como é constatada principalmente naquelas que possuem como agentes etiológicos *C. glabrata* e *C. krusei*, os quais se tornaram patógenos importantes pelo aumento de infecções devido à resistência a esse antifúngico (Chavanete *et al.* 1994; Katiyar; Edlind, 2001).

Com a introdução de fluconazol para profilaxia e tratamento de micoses em indivíduos com aids, o uso prolongado dessa droga tem resultado na resistência de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida*, assim como, na recidiva da candidíase, especialmente nesse grupo de pacientes (Dupont *et al.*, 1994; Pfaller *et al.*, 1994; Colombo *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1995; Barchiesi *et al.*, 1996; Evans, 1998; Jandourek *et al.*, 1998).

No início da epidemia de aids, poucos agentes antifúngicos eram disponíveis (anfotericina B, nistatina, cetoconazol e fluconazol). Espécies de *Candida* resistentes a essas drogas se espalharam rapidamente, e foi o principal motivo na falha dos tratamentos ao final da década de 80 a meados dos anos 90. Juntamente com a introdução de terapias antiretrovirais altamente ativas, a formulação de itraconazol oral em 1997 representou um real avanço na melhoria das infecções fúngicas durante algum tempo (Smith *et al.*, 1999; Koks *et al.*, 2002).

Outro fator que pode interferir na sensibilidade antifúngica é a estocagem do microrganismo a baixas temperaturas, que pode levar a uma diminuição na eficiência da produção de proteínas, baixa fluidez da membrana celular, estabilização da dupla hélice ou da estrutura secundária da molécula de DNA ou RNA, lento arranjo estrutural das proteínas e decréscimo da atividade enzimática. É pouco provável, no entanto, que tal forma de estocagem resulte na resistência de espécies fúngicas a azólicos, visto que linhagens de *Candida* ATCC, existentes há anos, foram estocadas de diversas formas, sem, no entanto, serem alvo de qualquer alteração em suas características fenotípicas e morfológicas, incluindo valores de sensibilidade antifúngica (Graumann; Marahiel, 1996; Panoff *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2007).

A falha no acúmulo de antifúngicos azólicos no interior da célula, alterações nas bombas de efluxo e mutações no gene ERG11 têm sido identificadas como as principais causas de resistência de *Candida* spp. a essas drogas. Modificações na interação da droga com a enzima-alvo também são citadas como causa de resistência (Vandeputte *et al.*, 2005).

Asai *et al.* (1999), Kakeya *et al.* (2000) e Vanden Bossche *et al.* (2003), afirmam que mutação no gene ERG11 não acarreta em alteração da atividade da enzima 14 α -dimetilase pelos antifúngicos azólicos, permitindo aos mutantes a capacidade de uma maior produção de ergosterol, sendo uma eficiente estratégia de resistência constatada em linhagens de *C. albicans* testadas frente fluconazol.

A presença de resistência em espécies de *Candida* geralmente está associada não apenas a um, mas a vários fatores que atuam ao mesmo tempo, resultando na expressão da característica de resistência. Investigação com isolados de *C. albicans* resistentes a fluconazol, constataram uma natureza multifatorial na resistência a tal fármaco, com predominância de mecanismos como a “superexpressão” de gens (CDR e MDR1) que codificam bombas de efluxo, associada a essa “superexpressão”, bem como, mutações no gene ERG11. Múltiplos mecanismos combinados foram detectados em 75% dos isolados resistentes. Estes autores observaram ainda que isolados resistentes a fluconazol, não apresenta obrigatoriamente resistência a demais drogas antifúngicas, no entanto, é notória a diminuição da sensibilidade de isolados clínicos resistentes a fluconazol, frente a outros derivados azólicos, tais como itraconazol, voriconazol e posaconazol (Perea *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2002).

Diversas são as causas descritas para o fenômeno da resistência apresentada por espécies de *Candida*, como; mutações em genes, redução da permeabilidade da membrana, exposição contínua a antifúngicos, entre outras (Perea *et al.*, 2001; Sanglard; Odds, 2002; Chong *et al.*, 2007). Com relação à resistência que certas linhagens de *Candida* apresentam aos derivados azólicos, as principais causas citadas são modificações no gene CDR, que codifica bombas de efluxo, bem como redução da permeabilidade da membrana a tal grupo de fármacos (Perea *et al.*, 2001) e pontos de mutação no gene ERG11, responsável pela produção da enzima 14 α -dimetilase. Vale salientar que alterações no gene MDR1, também responsável por codificar bombas de efluxo, estão associadas, exclusivamente, a resistência a fluconazol (Morschhäuser, 2002; Vandeputte *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de resistência aos derivados azólicos pode ser também decorrente da exposição prolongada do patógeno a este grupo de drogas, fato observado em isolados de *C. albicans* e comum em pacientes portadores de HIV (Human Immunodeficiency Virus). Comumente tais pacientes apresentam candidíase orofaríngea e são tratados com fluconazol oral, que apesar de eficiente e possuir pequena toxicidade, acarreta aumento da incidência de resistência clínica, levando a infecção por isolados resistentes a este fármaco. A resistência clínica pode ocorrer por variados mecanismos, tais como: infecção por microrganismo que apresentam resistência intrínseca; seleção de cepas resistentes, oriunda da pressão exercida pelo antifúngico; e desenvolvimento de resistência no microrganismo anteriormente sensível (Martínez *et al.*, 2002).

Padronização do valor da concentração inibitória mínima auxiliou os pesquisadores a descobrirem resistência de espécies fúngicas as drogas. Resistência cruzada deve ser considerada como um importante problema ao tratamento antimicótico no futuro, e assim a determinação da sensibilidade dessas espécies a essas drogas é uma importante informação que deve ser levada em consideração no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Heterogeneidade na sensibilidade de espécies aos derivados azólicos é notável, sugerindo diferenças na farmacodinâmica desses antifúngicos, apesar de semelhanças estruturais aparentes. Os mecanismos de ação e resistência aos azólicos ainda não são totalmente entendidos, e, portanto, são requeridos estudos adicionais aos padrões de sensibilidade e resistência dos agentes etiológicos (Morschhäuser, 2002).

Alguns pesquisadores vêm correlacionando a resposta clínica às infecções fúngicas com valores precisos de sensibilidade determinados *in vitro* (Forrest, 2006). Acredita-se que infecções fúngicas com isolados sensíveis, responderão positivamente a terapêutica instituída em 90% dos casos, enquanto que infecções devido a isolados resistentes responderão no máximo em 60% dos casos. Com essas observações, alguns autores propõem a “Regra 90/60”, predizendo a probabilidade de sucesso da terapia baseado nos resultados obtidos por testes padronizados. Entretanto, é evidente a possibilidade de ocorrer uma infecção fúngica refratária e/ou recorrente, mesmo o isolado sendo sensível nos testes *in vitro*, fato observado em inúmeros casos relatados a literatura (Rex; Pfaller, 2002; Pfaller, 2005).

O número de casos relatados de candidíase, de acordo com Treader *et al.* (2008) declinou ao seu mais baixo nível em 1999. Discrepante a essa tendência regressiva, os casos aumentaram novamente nos anos seguintes, com o número de casos hoje excedendo aqueles em meados de 1990 (López-Martínez, 2010).

Treader *et al.* (2008) relataram interessante caso de candidíase esofágica recorrente e refratária, a todas as classes de antifúngicos existentes, em um paciente do sexo masculino de 40 anos com aids. Em 2002, o paciente foi prosperamente tratado com 400mg diários de fluconazol, e subsequentemente, profilaxia com 50mg diária desta droga foi instituída, porém interrompida quando a contagem de células CD4 aumentou. Em 2004 o paciente foi readmitido no hospital com candidíase esofágica, mas o tratamento com fluconazol falhou e a anfotericina B teve que ser descontinuado por disfunção renal, entretanto 70mg diários de caspofungina levou a um rápido sucesso terapêutico. Um ano depois, outro episódio da doença não conseguiu ser solucionada com

casposfungina, mas com 2x400mg de posaconazol ao dia. Em 2006, administração de 1600mg diários de posaconazol, 200mg diários de anidulofungina ou a combinação de ambas as drogas não debelou uma nova recidiva, sendo prosperamente utilizado anfotericina B lipossomal associado ao monitoramento das funções renais. Colonização simultânea por *C. albicans* e *C. glabrata* ocorreu em 2007, e mesmo utilizando-se anfotericina B lipossomal não houve cura total. Os autores citam que, atualmente o paciente possui esofagite moderada e persistente com comprometimento oral. Este relato de caso destaca a dificuldade no tratamento de infecções por *Candida* multirresistentes, com as drogas comercialmente disponíveis.

Anfotericina B foi desenvolvida na década de 50, porém ainda permanece muitas questões sobre sua farmacocinética, toxicidade e mecanismo de ação; é considerada a mais efetiva droga fungicida para o tratamento de infecções sistêmicas como candidíase, criptococose, aspergilose, paracoccidioidomicose, histoplasmoses e outras (Colombo *et al.*, 1994; Sperry *et al.*, 1998; Luna *et al.*, 2000; Knoppert *et al.*, 2001; Modo, 2001).

Entretanto, resistência a anfotericina B em espécies de *Candida* vem sendo significativamente relatada. Kovacicova *et al.* (2001) documentaram três casos de fungemia em crianças após neurocirurgia, devido a isolados de *Candida* resistentes a esse poliêno. Os três isolados, um de *C. guilliermondi*, um de *C. lusitaniae* e outro de *C. parapsilosis*, mostraram CIM superiores a 2 µg/mL. Dois dentre os três pacientes receberam tratamento profilático com anfotericina B por 5-11 dias. Krcmery e Barnes (2002) descrevem a resistência variada que isolados clínicos de *Candida* possuem a anfotericina B. Cinco a 20% dos isolados de *C. lusitaniae* e *C. rugosa*, 10 a 15% de *C. krusei* e 5 a 10% de *C. guilliermondi* apresentam resistência. Esse padrão de sensibilidade significativamente variável torna necessário realizar testes *in vitro* para determinar as CIM das leveduras de isolados clínicos.

Colombo *et al.* (2003) descreveram a hospitalização de seis pacientes em uma UTI no Brasil apresentando candidemia por *C. rugosa*. Durante este surto, quatro entre os seis pacientes morreram apesar de tratamento com anfotericina B. Foram relatados 15 casos de candidemia devido a *C. rugosa*. Nesses casos, nistatina foi utilizada e associada ao aumento da fungemia causada por isolados resistentes. Subsequente a esses relatos foram constatados outros isolados clínicos de *C. rugosa* refratários a drogas antifúngicas da classe dos poliênos (Dubé *et al.*, 1994; Hernandez *et al.*, 2004).

Além da resistência intrínseca que isolados clínicos de *Candida* podem apresentar, e assim, conduzir o paciente ao óbito, deve-se ter atenção às interações medicamentosas clinicamente importantes que possam diminuir a biodisponibilidade dos antifúngicos. Esta observação é extremamente importante ao se tratar de micoses oportunistas, como a candidíase, onde o paciente possui alguma patologia de base, e, portanto, faz uso de outras medicações (Martínez *et al.*, 2002).

Stone *et al.* (2004) analisaram detalhadamente a interação entre caspofungina e rifamicina em voluntários saudáveis, e observaram que o agente antibacteriano pode diminuir as concentrações plasmáticas do antimicótico em até 30%. Estes relatos demonstram que as interações entre caspofungina e rifamicina são clinicamente importantes.

Nesse contexto, Belmares *et al.* (2005) relataram um caso de falha no tratamento de fungemia por *C. krusei* com caspofungina em uma paciente filipina de 48 anos que também recebia concomitantemente 600mg ao dia de rifamicina como parte de seu tratamento para tuberculose. Teste de sensibilidade *in vitro* padronizado pelo CLSI foi realizado com a levedura isolada a partir do sangue, e os resultados da CIM em 24 e 48h foram 0,06 e 0,125 µg/mL, respectivamente. Portanto, não foi observada resistência que explicasse a falha no tratamento.

Embora toda essa resistência aos antimicóticos esteja relatada, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América recomenda que tratamento inicial em um paciente com candidemia ou candidíase disseminada inclua algum derivado azólico, caspofungina ou anfotericina B, ou uma combinação de fluconazol e anfotericina B nos casos recorrentes. Isso ocorre pela falta de alternativas terapêuticas com drogas mais eficientes e menos tóxicas (Perfect, 2004).

2.4 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

O emergente aumento na resistência aos compostos antifúngicos e o número reduzido de drogas comercialmente disponíveis, muitas dessas fungistáticas, conduziu os pesquisadores a busca permanente de alternativas terapêuticas de menor custo e menor toxicidade ao hospedeiro (Yanagida, 2000; Mondello *et al.*, 2003).

Nesse contexto, diversos produtos de origem vegetal mostram ser potencialmente interessantes, no que se refere a sua atividade antimicrobiana. Dentre estas, destacam-se a malva, goiabeira e aroeira. A malva (*Malva Sylvestris*) apresenta propriedades

diuréticas e expectorantes, podendo também ser utilizada no tratamento de inflamações das mucosas. A aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* All) possui crescente uso farmacológico, pois a entrecasca possui Urundeuva A, Urundeuva B e taninos. A goiabeira (*Psidium guajava* Linn) é bastante utilizada em casos de diarreia, mas possui também atividade antimicrobiana, antifúngica e antitussígena. Estudos mostraram que os extratos da malva, goiabeira e aroeira-do-sertão, podem ser utilizados, clinicamente, no tratamento da candidose oral e na prevenção de formação do biofilme dental (Cardoso, 1998; Santos *et al.*, 1998; Bandeira, 2000; Yanagida, 2000; Alves *et al.*, 2009).

Notável progresso no tratamento para doenças infecciosas bacterianas têm sido alcançado, diferentemente dos tratamentos antifúngicos, em especial aqueles para micoses sistêmicas oportunistas. Medicamentos com toxicidade seletiva às bactérias são desenvolvidos com base na natureza procariótica destes microrganismos; contudo, a formulação de drogas antifúngicas torna-se mais complexa devido à natureza eucariótica das células fúngicas e células humanas. Desta forma, vários pesquisadores afirmam a necessidade de novos antifúngicos mais potentes e menos tóxicos (Randhawa, 2000).

Vários estudos têm demonstrado que espécies de *Candida* são sensíveis a extrato de própolis (Ota *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002; Kartal *et al.*, 2003). Desta maneira, gel a base de extrato de própolis pode ser considerado como uma alternativa para o tratamento de casos de estomatite por espécies *Candida*. A própolis conduz a mudanças na parede celular, promovendo dilatação e ruptura na membrana (Mello *et al.*, 2006).

Embora com mecanismo de ação antimicrobiano da própolis não completamente compreendido, por ser complexo e possuir composição variada, seu uso tem sido uma alternativa terapêutica. Os principais constituintes que possuem atividade antimicrobiana conhecidos são principalmente os flavonóides e o ácido cinâmico (Bankova *et al.*, 2000). Análises ultraestruturais, com microscopia eletrônica, demonstraram hiperplasia e mudanças na superfície do agente etiológico.

Santos *et al.* (2008) desenvolveram um estudo piloto para avaliar a eficácia clínica de um novo gel de própolis, livre de etanol com propriedades mucoadesivas, em pacientes diagnosticados com estomatite. Neste trabalho, o gel a base de própolis foi capaz de curar as áreas afetadas em todos os 15 pacientes. O produto foi bem aceito e nenhuma alergia ou irritação foi relatada.

Plantas aromáticas são corriqueiramente usadas na medicina tradicional como agentes antimicrobianos e seus óleos essenciais, misturas de compostos voláteis naturais

isolados por destilação, são conhecidos desde a antiguidade por possuir propriedades antifúngicas e antibacterianas. Alguns trabalhos sugerem que vários óleos essenciais demonstraram importante atividade contra leveduras, dermatófitos e linhagens de *Aspergillus* (Mondello *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2003; Pina-Vaz *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006).

O potencial de óleo da folha de *Juniperus oxycedrus*, conhecido popularmente como cedro-da-Espanha, como agente antifúngico, contra espécies de *Aspergillus*, *Candida* e particularmente dermatófitos, tem-se destacado por seu efeito fungicida. Concentrações inibitórias e letais mínimas deste óleo são comparáveis com aqueles relatados para o óleo essencial fenólico de *Thymbra capitata* (Salgueiro *et al.*, 2004; Cavaleiro *et al.*, 2006).

Hirasawa e Takada (2004) sugerem que os produtos polifenólicos presentes no chá verde, possuem atividade antimicótica. O galato de epigallocatequina (EGC), catequina presente neste chá, pode ser usado na terapia antifúngica da candidíase, com ou sem associação a outros agentes antimicóticos, após relatarem a sensibilidade de *C. albicans* a este composto.

Park *et al.* (2006) verificaram a sensibilidade de 21 isolados clínicos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ao ECG, e de seis drogas antifúngicas comercialmente disponíveis. Entre as linhagens testadas, isolados de *C. glabrata* foram mais sensíveis ao ECG que ao fluconazol e igualmente sensíveis a anfotericina B. *C. krusei* foram 2 a 8 vezes mais sensíveis que fluconazol e fluocitosina, respectivamente. Esse estudo mostra que esse composto pode ser usado no campo da terapia antifúngica, entretanto, anteriormente, seu mecanismo de ação deve ser inteiramente compreendido, através principalmente de estudos *in vivo*.

Embora vários produtos naturais venham sendo empiricamente utilizados por suas propriedades antifúngicas, o número limitado de drogas antimicóticas comercialmente disponíveis ainda é um ponto de preocupação no tratamento das infecções por fungos. Muitas são tóxicas, produzem recorrência por serem fungistáticas e não fungicidas ou levam ao desenvolvimento da resistência devido ao prolongado período de administração, além de apresentarem um limitado espectro de atividade, baixa distribuição tecidual, fraca penetração no sistema nervoso central (SNC) ou custo elevado (Katritzky *et al.*, 2008).

Observa-se a clara necessidade de descobrir novas estruturas com propriedades antifúngicas. Assim, a obtenção sintética dessas estruturas, como ocorre com derivados azólicos (Williams; Lemke, 2002) e candinas (Gonzalez *et al.*, 2001) é outra alternativa que pode conduzir ao desenvolvimento de novas drogas, habilitadas a serem administradas em pacientes com quadros clínicos sistêmicos e oportunistas (Emani *et al.*, 2008).

A classe de substâncias denominada genericamente de azol é composta por heterocíclicos aromáticos nitrogenados de cinco membros, contendo um ou mais átomos de nitrogênio. Esses compostos heterocíclicos de cinco membros podem apresentar átomos de enxofre ou oxigênio, adicionalmente a um átomo de nitrogênio, recebendo a denominação de azol, sendo chamados, respectivamente, de tiazol ou oxazol (Melo *et al.*, 2006).

Conforme Ferreira *et al.* (1999) dentre os sistemas heterocíclicos mais estudados encontram-se os triazóis, que têm despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, que vão desde usos como explosivos, até como agroquímicos e fármacos. Ferreira e seus colaboradores (1999) ainda afirmam que todos os triazóis são de origem sintética e não há indicações, até o momento, de que estes heterocíclicos possam ser encontrados na natureza.

Os triazóis são substâncias hetero-aromáticas, apresentando seis elétrons π , sendo que aqueles que não apresentam substituintes no átomo de nitrogênio podem se apresentar como três estruturas tautoméricas. Podem ser classificados como vicinais (1,2,3-triazóis) ou como triazóis simétricos (1,2,4-triazóis), sendo os últimos os mais investigados (Grimett, 1979).

Melo *et al.* (2006) advoga que os triazóis podem ser obtidos com uma grande variedade de substituintes e possuindo diversos padrões estruturais (mono-, bis- e policíclicos). As rotas sintéticas existentes para preparação dessas moléculas são eficientes, envolvendo a utilização de reagentes sem grande complexidade. Os estudos visando à síntese de novos derivados estão em evolução, bem como a avaliação das potenciais aplicações farmacológicas e tecnológicas dos novos compostos desta classe. Os autores defendem ainda que os 1,2,3-triazóis são heterociclos de grande importância, por sua atividade biológica diversificada, destacando-se como potenciais fármacos de alta eficácia contra doenças de impacto social crescente, como aids e câncer, bem como os 1,2,4-triazóis que possuem uma pronunciada atividade frente fungos e bactérias.

Derivados do anel aromático tiofeno, também obtidos sinteticamente, estão presentes em compostos biologicamente ativos com várias propriedades relatadas por diversos autores. Entre essas propriedades foram citadas: antiparasitária (Brendle *et al.*, 2002; Shama *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007), antimicobacteriana (Rando *et al.*, 2006), antiviral (Bonini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008) e antifúngica (Chobot *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Ryu *et al.*, 2005; Fokialakis *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2008).

Dentre esses compostos se encontra o nitrato de sertaconazol, um novo agente antifúngico de largo espectro desenvolvido para o tratamento de infecções superficiais nas mucosas e no tecido cutâneo. Este antifúngico vem sendo testado *in vitro* frente isolados clínicos de *Candida*, *Malassezia furfur* e espécies de dermatófitos apresentando resultados satisfatórios (Torres *et al.*, 2000). Para aumentar seu potencial antifúngico, este imidazólico foi sintetizado com um benzotiofeno lipofílico, que ajuda em sua penetração nas camadas queratinizadas da pele sem absorção na circulação sistêmica (Zsolt, 2002; Day, 2005).

2.5 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (Sakata *et al.*, 2007).

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármaco, ou de outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes as formas farmacêuticas de liberação controlada. Uma ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica (Das; Das, 2003).

Esses sistemas oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional, ou seja, a medicação livre não encapsulada. Inúmeros trabalhos evidenciaram que as principais vantagens da utilização dessa tecnologia são: 1) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz; 2) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de

permanência na circulação; 3) administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); 4) possibilidade de oferecer mais de um agente terapêutico simultaneamente (terapia de combinação) (Peer *et al.*, 2007; Davis; Chen; Shin, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, as formulações nanométricas podem penetrar na célula hospedeira, através da endocitose, e liberar o agente antimicrobiano diretamente nos parasitas intracelulares (Wagner *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso (Zhang; Granick, 2006). Sua estrutura foi descrita pela primeira vez em 1965 por Bangham e colaboradores. A proposta de utilizá-lo no encapsulamento de fármacos para controlar a liberação medicamentosa surgiu na década de 1970 (New; Chance; Heath, 1981).

Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolipídeos e esteróis. Entre fosfolipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomais está a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas nas preparações lipossomais, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio. Os fosfolipídeos são lipídios de origem natural ou sintética; sendo os principais componentes das membranas celulares apresentando a capacidade de auto-organização quando em soluções. Portanto, os lipossomas são compostos por uma porção hidrofílica (cavidade interna aquosa) e outra hidrofóbica (bicamada lipídica) (Batista *et al.*, 2007).

Atualmente, os lipossomas são os mais utilizados nos sistemas de liberação de fármacos antimicrobianos. Uma das características distintivas dos lipossomas é a sua estrutura de bicamada lipídica, que mimetiza as membranas celulares e pode fundir-se facilmente com a membrana celular dos agentes infecciosos (bactérias e fungos) e liberar a medicação no meio intracelular (Zhang *et al.*, 2010).

Formulações lipossomais de anfotericina B vêm sendo amplamente utilizada na clínica médica para o tratamento de micoses por espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, e outros fungos de alta e baixa patogenicidade (Kelsey *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2001).

Em 1994, Adler-Moore e colaboradores observaram alta especificidade da AmBisome® para os sítios de infecções fúngicas. Utilizando formulações lipídicas marcadas com fluoresceína foi possível verificar, através de testes de infecção

experimental em camundongos, que os lipossomas fluorescentes estavam localizados nos focos de infecções fúngicas.

Segundo Ostrosky-Zeichner *et al.* (2003) a formulação lipossomal do antifúngico reconhecidamente mais antigo que existe representa o novo “Gold Standard” nas comparações de terapias clínicas antimicóticas. Essa formulação garante especificidade e afinidade, uma vez que sua densidade eletrônica negativa conferida pelo fosfolípido diestearoilfosfatidilglicerol propicia atração eletrostática com a superfície da célula fúngica e incompatibilidade com as células de mamíferos, minimizando a toxicidade do fármaco.

Conseqüentemente outros trabalhos realizados com modelos experimentais *in vivo* constataram melhor eficácia no tratamento de micoses sistêmicas com antifúngicos na formulação lipossomal (Martin *et al.*, 2003; Gavalda *et al.*, 2005; Takemoto *et al.* 2006).

A estabilidade dos lipossomas é fundamental em todos os passos da sua produção e administração, desde o armazenamento até a liberação do fármaco (Vemuri; Rhodes, 1995). Os fatores que alteram a estabilidade dos lipossomas podem ser subdivididos em físicos, químicos e biológicos, os quais estão intimamente relacionados entre si (Lasic, 1998; Samuni *et al.*, 2000).

Sharma e Sharma (1997) afirmam que as formulações finais dos lipossomas podem apresentar um baixo tempo de meia vida, em parte devido à instabilidade física e química. O estudo da estabilidade dos lipossomas deve incluir a caracterização do produto final e a avaliação da estabilidade durante o armazenamento da formulação contendo lipossomas. Outros fatores que devem ser levados em consideração quanto a esse estudo são as características da formulação e as condições do meio ambiente. As características da formulação são descritas como: pH, estado de tamponamento, força iônica e solventes. Os fatores do meio ambiente que exerce influência na estabilidade são: temperatura, luz, calor e oxigênio. Estes fatores podem iniciar reações químicas e físicas, como por exemplo, mudanças na distribuição de tamanho das vesículas, oxidação e hidrólise dos lipídeos (Edwards; Baeumner, 2006).

Segundo Gulati e colaboradores (1998), as preparações lipossomais devem se manter estáveis por um período mínimo de 1,5 a 2 anos, para serem utilizadas na clínica médica, desde que observados os devidos cuidados com seu acondicionamento e conservação.

O principal componente das formulações de lipossomas é o lipídio. A porção lipídica dos lipossomas deriva de fosfolipídios de origem natural ou sintética. Os fosfolipídios são sensíveis à hidrólise na ligação éster e contêm ácido graxos insaturados que podem sofrer reações oxidativas. Os produtos destas reações podem causar mudanças na permeabilidade da bicamada e alterar o tempo de meia vida dos lipossomas (Samuni *et al.*, 2000; Heurtault *et al.*, 2003).

Samuni e colaboradores (2000) identificaram que a peroxidação e a hidrólise lipídica são as duas maiores formas de degradação lipídica. A degradação oxidativa dos lipídios em geral pode ser minimizada pela proteção das preparações lipídicas da exposição à luz; pelo armazenamento em baixas temperaturas, pela adição de antioxidantes como o alfa-tocoferol ou butil hidroxitolueno (BHT) e pela adição de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) à formulação lipídica para remover metais pesados. A hidrólise lipídica leva à formação de liso-fosfatidilcolina (lyso-PC). A presença do lyso-PC acentua a permeabilidade dos lipossomas, o que prejudica a integridade da formulação.

De acordo com Gulat *et al.* (1998) o perfil da estabilidade química da molécula do fármaco pode ser inteiramente diferente do perfil da estabilidade da preparação de lipossomas. Desta forma, é essencial o desenvolvimento de protocolos de estabilidade também para o estudo da integridade do fármaco por um determinado período de tempo. A maioria dos problemas de estabilidade é mais pronunciada em lipossomas que contêm moléculas de baixo peso molecular e fármacos solúveis em água. Para reverter a instabilidade de fármacos solúveis em água, faz-se necessário a conversão da droga polar para uma pró-droga lipofílica com a subsequente incorporação em lipossomas.

Edwards e Baeumner (2006) defendem que preparações de lipossomas que apresentam uma heterogeneidade em seu tamanho representam um potencial problema em sua estabilidade física. A distribuição média em tamanho dos lipossomas é determinada pelo tempo e maneira de preparação e pode ser alterada durante o armazenamento. A instabilidade física pode ainda ser causada pelo vazamento do fármaco encapsulado na vesícula, e/ou agregação ou fusão das vesículas para formar grandes partículas. Este processo influencia o desempenho *in vivo* da formulação, podendo afetar o índice terapêutico do fármaco (Sharma; Sharma, 1997).

Muitas tentativas têm sido realizadas para aperfeiçoar a estabilidade dos lipossomas. Entre elas, a modificação da superfície dos lipossomas é um método atrativo

para melhorar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* do sistema (Takeuchi *et al.*, 1998). A estrutura dos lipossomas pode ser reforçada por vários métodos, entre eles, pela polimerização dos fosfolipídios com um dieno ou um radical acrilato, pela combinação com polímeros e pela complexação iônica com polieletrólitos naturais (Ishihara *et al.*, 2002).

A introdução de um grupo hidrofóbico em lipossomas foi investigada por vários pesquisadores (Ishihara *et al.*, 2002). A superfície dos lipossomas foi revestida com polissacarídeos tendo uma fração colesterol como uma âncora para fixação de cadeias polissacarídicas, melhorando a estabilidade dos lipossomas, e, além disso, conferindo uma especificidade à célula alvo (Ishihara *et al.*, 2002). Entretanto, polímeros hidrofóbicos com grupos modificados podem induzir instabilidade aos lipossomas devido à interpenetração do grupo hidrofóbico na membrana lipossomal (Savva *et al.*, 1999). Por outro lado, polímeros solúveis em água capazes de interagir com a superfície da membrana lipossomal têm se mostrado adequados para a estabilização dos lipossomas (Ishihara *et al.*, 2002).

Lasic (1998) advoga que a estabilidade biológica pode ser determinada pelo tempo de circulação dos lipossomas na corrente sangüínea, o que está diretamente relacionado com a presença de agentes que interagem com os lipossomas. A compatibilidade sangüínea é um importante fator na avaliação dos lipossomas como carreadores de fármaco na corrente circulatória, uma vez que as células sangüíneas iniciam o processo de coagulação imediatamente quando em contato com materiais estranhos (Ceh *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 2000; Ishihara *et al.*, 2002).

Para exercer atividade terapêutica, faz-se necessário que o sistema carreador contendo o fármaco permaneça tempo suficiente na corrente sangüínea, a fim de atingir o alvo. Entretanto, quando lipossomas são administrados *in vivo*, são rapidamente removidos da corrente circulatória através das células fagocitárias do sistema reticulo endotelial (RES) (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2007).

De acordo com Torchilin (2005) o tamanho e a composição lipídica são determinantes na permanência dos lipossomas na circulação. Quanto ao tamanho, a redução do diâmetro dos lipossomas implica em um menor reconhecimento pelo RES e quanto à sua composição lipídica, a inclusão de fosfolipídios saturados e esteróis, que reduzem a fluidez da membrana resultam em uma maior permanência desta preparação na circulação sangüínea.

Segundo Gabizon *et al.* (1997) e Torchilin (2005) o revestimento polimérico empregando polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) é um método alternativo para a modificação da superfície dos lipossomas, conferindo proteção às vesículas contra a opsonização e mecanismo de eliminação. Além disso, consiste em um método da extrema simplicidade através da mistura da suspensão lipossomal com a solução polimérica, não promovendo qualquer ligação química entre o polímero e a molécula lipídica.

A presença de grupos inertes na superfície dos lipossomas reduz as interações com macromoléculas e desta forma estabilizam estas vesículas. A estabilidade biológica e coloidal dos lipossomas foi drasticamente aumentada pelo seu revestimento com polímeros hidrofílicos inertes, impedindo a penetração e adsorção de opsoninas e promovendo um baixo reconhecimento dos lipossomas pela células do sistema retículo endotelial. Estes lipossomas revestidos de longa permanência na circulação sanguínea são chamadas de lipossomas estericamente estabilizados e exibem uma meia vida mais extensa comparados aos chamados lipossomas convencionais. Devido a esta habilidade de se evadirem das defesas do sistema imune, eles também são referidos como lipossomas furtivos (Abu Lila *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009).

Existem vários métodos de preparação de lipossomas, como por exemplo, extrusão, evaporação em fase-reversa microfluidização e hidratação do filme lipídico. No método da hidratação do filme lipídico, os lipídeos são solubilizados em solvente orgânico, em seguida, forma-se o filme lipídico pela evaporação do(s) solvente(s). Então, a fase aquosa é adicionada ao balão formando espontaneamente as vesículas. O diâmetro médio dos lipossomas obtidos por esse método é bastante elevado sendo apropriado para produzir vesículas multilamelares. Os lipossomas obtidos pelo método da hidratação do filme lipídico podem ser submetidos à ação de ultrassom com ajuda de uma sonda ou banho. A energia liberada promove a diminuição do raio das vesículas multilamelares tomando-as vesículas unilamelares (Santos; Castanho, 2002; Frezard *et al.*, 2005).

A taxa de encapsulação de um composto em lipossomas e a relação composto/lipídeo são dois parâmetros importantes a serem considerados na escolha do método de preparação; teoricamente taxa de encapsulação em torno de 100% pode ser obtida com fármacos lipofílicos (Gulati *et al.*, 1998; Frezard *et al.*, 2005).

2.6 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando para isso campos eletromagnéticos. Esse equipamento atua como uma balança de íons de altíssima precisão e, em sua grande maioria, é composto por uma fonte ionizante, analisador(es) e detector(es). Como resultado é emitido um gráfico onde o eixo y representa a intensidade do sinal dos íons e o eixo x, a razão m/z destes (Crotti, 2006).

Apesar de a espectrometria de massa ser uma tecnologia usada há bastante tempo no campo das engenharias e da física, era pouco utilizada nas ciências da saúde por degradar biomoléculas ao ionizá-las. Recentemente foram desenvolvidas duas técnicas capazes de ionizar biomoléculas de alto peso molecular, como oligopeptídeos e proteínas (Wang, 1999). Estas técnicas também são capazes de alterar o analito de sua fase sólida ou líquida para gasosa, estado necessário para realização da análise da espectrometria de massa sem degradá-lo.

Segundo Crotti (2006) as técnicas avançadas em espectrometria de massas diferem principalmente no modo de ionização das amostras. Essa característica permitiu o uso da técnica em muitas áreas, pois a análise de proteínas, peptídeos, açúcares, etc, que antes não eram possíveis de serem detectados por técnicas antigas de ionização, como EI (*electron ionization*), agora são analisados rotineiramente.

A introdução dos métodos modernos de ionização no final da década de 80 causou uma verdadeira revolução na área da espectrometria de massas fazendo com que, hoje, ela seja empregada na análise de polímeros sintéticos, complexos organometálicos e compostos orgânicos de interesse ambiental. A maior expansão, no entanto, se deu em bioquímica, biologia molecular, petroquímica e vem crescendo na área de ciências de alimentos. Um levantamento mostra que em 2000, 65% dos espectrômetros de massas adquiridos recentemente são utilizados nas áreas de análise de fármacos e metabólitos, identificação de proteínas e análises clínicas (Ibañez *et al.*, 2001).

Nos laboratórios de análises clínicas, a identificação rápida e confiável das espécies de *Candida* é essencial para o tratamento antifúngico, no qual os métodos bioquímicos convencionais de diagnóstico são morosos (Qian *et al.* 2008). A identificação microbiana com base nos espectros espécie-específicos de peptídeos e

proteínas por espectrometria de massa é notavelmente reprodutível, e explicada através da mensuração de proteínas altamente abundantes e expressas constantemente. Entre tais moléculas, encontram-se as de origem ribossomal que apresentam massa molecular entre 2000 e 20000 Da, além de poucos metabólitos secundários, possibilitando facilmente sua utilização como biomarcadores (Veen *et al.* 2010).

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma técnica físico-química rápida e reprodutível utilizada para análise de moléculas orgânicas. Esta técnica vem sendo recentemente usada como uma abordagem fenotípica para a identificação de fungos (Santos *et al.* 2010). Neste caso, o interesse da técnica em questão é a análise das células intactas, onde o espectro gerado é interpretado como um *fingerprint* celular, sendo portanto designada por MALDI-TOF IC (*Intact Cell*) MS.

Vários pesquisadores destacam a grande contribuição que está revolucionária técnica trouxe para o conhecimento científico a cerca da identificação desse grupo de microrganismos e já tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz para testes rápidos nas análises clínicas (Qian *et al.* 2008, Marinach-Patrice *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2010, Putignani *et al.* 2010).

A técnica de MALDI-TOF ICMS, quando aplicada à identificação de fungos, está fundamentada principalmente na análise das proteínas ribossomais. Além destas proteínas, as proteínas constituintes das paredes do micélio e/ou esporos, no caso dos fungos filamentosos, e das paredes celulares, no caso das leveduras, também são de grande relevância neste processo de identificação.

Recentemente, Santos e colaboradores (2011) avaliaram a capacidade da técnica de espectrometria de massa através do MALDI-TOF ICMS para fenotipagem de leveduras de origem clínica taxonomicamente relacionadas. Neste estudo, 44 isolados de leveduras foram analisados, incluindo espécies de *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Lodderomyces elongisporus*. Os resultados do MALDI-TOF ICMS foram corroborados por testes bioquímicos e moleculares, onde as espécies foram identificadas com êxito e agrupadas de acordo com sua correlação taxonômica.

Veen e colaboradores (2010) utilizaram a técnica de MALDI-TOF ICMS para caracterizar 327 isolados clínicos de leveduras e bactérias na rotina de um laboratório de microbiologia médica. Neste trabalho, os autores avaliaram a capacidade do MALDI-TOF ICMS em identificar esses isolados obtidos a partir de amostras clínicas. Os isolados

também foram identificados por técnicas convencionais (Vitek II, API e testes bioquímicos) e as discrepâncias foram avaliadas através de análise molecular do gene 16S. Resultados espectrais mostraram que dos 327 isolados, 95.1% foram identificados corretamente em nível de gênero e 85.6% em nível de espécie. Autores concluíram que MALDI-TOF ICMS é uma técnica proteômica rápida, simples, de baixo custo e de alto aproveitamento para a identificação de leveduras isoladas clinicamente. Além disso, os isolados não identificados foram claramente associados com a ausência de espectros de linhagens referências na base de dados.

Putignani *et al.* (2010) avaliaram 303 isolados de leveduras de interesse clínico, principalmente espécies de *Candida*, através do MALDI-TOF ICMS. As análises espectrais foram comparadas ao Vitek-2, e quando discordantes, resultados do MALDI-TOF ICMS foram verificados por identificação genotípica através do sequenciamento da região hipervariável D2 de rRNA 25-28S. Os resultados mostraram que 257 dos 303 isolados foram identificados através do MALDI-TOF ICMS e corroborados por análises bioquímicas. Vinte e seis isolados apresentaram discordância entre as duas metodologias de identificação e apenas 20 não foram identificados pela técnica espectrométrica. Autores classificaram MALDI-TOF ICMS como uma técnica rápida que demonstrou alta performance analítica.

Marinach-Patrice e colaboradores (2010) desenvolveram uma metodologia para diagnóstico rápido de candidíase invasiva usando MALDI-TOF ICMS. Amostras de sangue humano foram utilizados para simular fungemia com 12 isolados de *Candida* pertencentes a seis espécies distintas, e os espectros do MALDI-TOF ICMS foram adquiridos diretamente a partir dos isolados cultivados nesse meio de cultura. Os sinais obtidos a partir das proteínas sanguíneas foram subtraídos a partir de *fingerprints* previamente obtidos para essas proteínas pelo MALDI-TOF ICMS, para favorecer a identificação dos isolados. Os autores concluíram que a obtenção espectral diretamente de alíquotas a partir das culturas sanguíneas positivas permite uma identificação rápida e reprodutível das principais espécies de *Candida*. A principal limitação descrita nesse trabalho se refere a base de dados, uma vez que o gênero *Candida* demonstra extensa diversidade genética.

A técnica de MALDI-TOF ICMS é bastante confiável para identificação de fungos até ao nível de espécie, e, portanto, poderá futuramente auxiliar os laboratórios de microbiologia médica a reduzir custos, bem como minimizar a emergência de isolados

resistentes aos antifúngicos comercialmente disponíveis. Contudo, em alguns casos, é possível a diferenciação desses microrganismos até ao nível de estirpe e/ou cepa. Esta técnica tem se mostrado de grande relevância para a investigação nas diferentes vertentes da micologia. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples, económica, rápida (entre 10 segundos e 2 min/amostra) e de elevada eficácia. Mas é de fundamental importância ter em consideração que a técnica de MALDI-TOF ICMS é uma abordagem entre muitas e deve, por isso, ser usada como uma ferramenta de apoio dentro de uma abordagem polifásica no processo de identificação fúngica (Santos *et al.* 2010).

**3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS
2-(AMINO-SUBSTITUÍDO)-4,5-DIALQUIL-TIOFENO-3-
CARBONITRILA**

Artigo submetido a:

Medicinal Chemistry

Avaliação da atividade antifúngica de derivados 2-(amino-substituído)-4,5-dialquil-tiofeno-3-carbonitrila

Reginaldo G. Lima-Neto,^a Francisco J. B. Mendonça Junior,^{b,c*} Tiago B. de Oliveira,^d Valéria R. A. Pereira,^e Maria C. A. de Lima,^d Ivan R. Pitta,^d Suely L. Galdino,^d Rayssa M. D. da Cruz,^a Rodrigo S. A. de Araújo^a & Rejane P. Neves^a

^a Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-910, Brazil

^b Laboratório de Síntese e Vetorização de Substâncias Bioativas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa 58.020-540, Brazil;

^c Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal, 5009, João Pessoa 58051-970, Brazil;

^d Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-910, Recife-PE, Brazil;

^e Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, Recife-PE;

Resumo - No presente trabalho relatamos a síntese de derivados de 2-(amino-substituídos)-4,5-dialquil-tiofeno-3-carbonitrila (**3a-g**, **4a-h**). Todos compostos sintetizados foram avaliados quanto as suas atividades antifúngicas *in vitro* contra 42 isolados clínicos de *Candida* e dois isolados clínicos de *Cryptococcus*, representando cinco diferentes espécies (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*), e comparados ao fluconazol e anfotericina B como agentes antimicóticos padrões. A maioria dos compostos mostrou moderada ou fraca atividade apresentando altos valores de CFM (800-3.200 µg/mL). O composto **4d** foi o mais ativo com valores de CFM variando entre 100-800 µg/mL. Estudo preliminar de SAR demonstrou que a presença de um anel de cicloalquil ligado ao anel tiofeno é essencial para a atividade antifúngica, sendo o melhor entre eles o de ciclohexila, presentes nos compostos **4d-f**. Estes compostos também foram avaliados citotoxicamente através de análise de incorporação de ³H-timidina em células de baço de comudongos BALB/c, não sendo evidenciado nenhum efeito citotóxico em concentrações menores que 1 µg/mL. Estes resultados sugerem que os derivados de tiofeno são promissores como novos agentes antifúngicos.

Palavras-Chave: atividade antifúngica, derivados de tiofeno, citotoxicidade, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*.

* Autor correspondente. Fax: +55 61 33421414; e-mail: franciscojaime@pq.cnpq.br

A incidência de infecções fúngicas invasivas causadas por patógenos oportunistas, freqüentemente caracterizada por altas taxas de mortalidade, tem aumentado progressivamente durante as últimas três décadas. Pacientes que se tornam imunocomprometidos por apresentar alguma doença de base, como leucemia, tuberculose, síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) ou pacientes que submetidos a quimioterapia ou transplante de órgão são particularmente suscetíveis a infecções fúngicas oportunistas.¹⁻⁶ As principais classes de antifúngicos encontraram resistência microbiana em aplicações clínicas.⁷ O surgimento de resistência fúngica aos antimicóticos clinicamente disponíveis como poliênos (anfotericina B), fluocitosina, azóis (fluconazol, miconazol e voriconazol) e equinocandinas (caspofungina), se tornou um problema de saúde pública no mundo.⁸⁻¹¹ Além disso, o limitado número de drogas antimicóticas existente é uma preocupação no tratamento de infecções fúngicas. A maior

parte das drogas disponíveis são tóxicas, além de apresentarem outras desvantagens, como seu espectro de atividade, biodisponibilidade, penetração no sistema nervoso central, e alto custo.¹²⁻¹⁶ Além disso, são produtos fungistáticos e não fungicidas, ou conduz em parte ao desenvolvimento de resistência devido aos períodos prolongados de administração, e o uso difundido para profilaxia e tratamento.¹⁷⁻¹⁹

Existe, portanto, a necessidade clara de descobrir novos compostos com propriedades antifúngicas que possam conduzir ao desenvolvimento de novas drogas, habilitadas a serem administradas em quadros clínicos sistêmicos e oportunistas. Neste contexto, derivados do anel aromático tiofeno estão presentes em compostos biologicamente ativos com várias propriedades relatadas por diversos autores. Entre essas propriedades foram citadas: antiparasitária,²⁰⁻²² antimicobacteriana,²³ analgésica e anti-inflamatória,²⁴⁻²⁶ antitumoral,²⁷⁻³⁰ antiviral,³¹⁻³² e especialmente atividade antifúngica,³³⁻³⁷ tornando esta uma estrutura bastante atrativa para químicos medicinais.

A partir dessas indicações na literatura e em busca de novos compostos bioativos, neste trabalho, nós relatamos a síntese de novos derivados de tiofeno e a avaliação de suas atividades antifúngica e citotóxica *in vitro*, determinando a concentração fungicida mínima (CFM) através do método de microdiluição em caldo, frente a quatro espécies de *Candida* (42 isolados) e duas amostras de *Cryptococcus neoformans*, todos isolados clínicos.

A síntese dos derivados de tiofeno **3a-g** e **4a-h** foi realizado através de reação em duas etapas, iniciando pela obtenção de 2-amino-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila **1**³⁸ e 2-amino-5,6-diidro-4H-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila, 2-amino-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila e 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila **2a-c**³⁹ seguidos por condensação destes com benzaldeídos substituído gerando as séries: 2-[(benzilideno-substituído)-amino]-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila **3a-g**⁴⁰, 2-[(benzilideno-substituído)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila **4a-c**, 2-[(benzilideno-substituído)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila **4d-f**⁴¹, 2-[(benzilideno-substituído)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila **4g,h** (Figura 1). Detalhes experimentais para este procedimento são citados nas notas e referências.⁴²

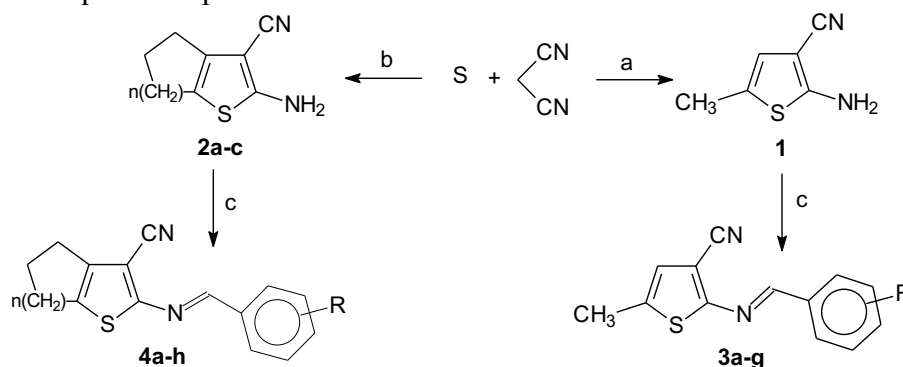


Figura 1. Reagentes e condições: (a) propionaldeído, Et₃N, DMSO, 0-20 °C; (b) ciclopentanona (ou ciclohexanona ou cicloheptanona), Et₃N, EtOH, rt; (c) ArCHO, ácido acético, EtOH, refluxo.

Os espectros de Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e microanálises foram consistentes com as estruturas propostas. Sinais a 8.38-8.93 ppm foram atribuídos ao grupamento imina (CH=N). Sinais do grupamento metil H-4 de **3a-g** apareceram inesperadamente como dupletos com constantes de acoplamento de 1,2 Hz, comprovando

a existência de um acoplamento do tipo J₄. As características físico-químicas destes compostos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas dos derivados de tiofenos **3a-g**, **4a-h**.

Compostos	R ^d	n ^e	P.M. ^f	Pf (°C) ^g	R _f ^h	(%) Rendimento
3a	2-NO ₂	-	271	177-179	0.64 ^a	86
3b	4-NO ₂	-	271	149-150	0.48 ^a	92
3c	4-OCH ₃	-	256	104-105	0.53 ^a	80
3d	4-N(CH ₃) ₂	-	269	153-154	0.44 ^a	98
3e	4-F	-	244	89-90	0.65 ^a	87
3f	2-indole	-	265	224-226	0.25 ^a	94
3g	4-OBz	-	332	143-145	0.67 ^a	90
4a	H	1	252	142-143	0.47 ^b	98
4b	4-Br	1	330	133-135	0.45 ^a	36
4c	4-Cl	1	286	140-140,5	0.54 ^b	89
4d	4-NO ₂	2	311	139-140	0.52 ^a	90
4e	4-Br	2	344	138-140	0.48 ^b	35
4f	4-Cl	2	300	135-136	0.47 ^b	99
4g	H	3	280	110-111	0,54 ^b	97
4h	4-Cl	3	314	104-105	0,50 ^c	92

^a eluente (7:3 Hex/AcOEt); ^b eluente (9:1 Hex/AcOEt); ^c eluente (9:1 MeOH/CHCl₃)

^d radical

^e número de repetições do radical

^f peso molecular

^g ponto de fusão

^h fator de retenção

A atividade antifúngica *in vitro* dos compostos sintetizados **3a-g** e **4a-h** foi investigada contra um total de 44 isolados fúngicos, incluindo quatro espécies de *Candida* (*C. albicans*, (20 isolados); *C. krusei*, (5 isolados); *C. parapsilosis*, (12 isolados) e *C. tropicalis*, (5 isolados) e *Cryptococcus neoformans* (2 isolados). Estas cepas foram obtidas na Coleção de Culturas - Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Os valores das concentrações fungicidas mínimas (CFMs) foram determinados através do método de microdiluição em caldo conforme as diretrizes do CLSI⁴³ (antigamente NCCLS)⁴⁴ que assegura resultados precisos e reproduzíveis. O valor da CFM (µg/mL) dos tiofenos para as diferentes leveduras patogênicas, comparados com fluconazol e anfotericina B são apresentados na tabela 2.⁴⁴⁻⁴⁷

Tabela 2. Atividade antifúngica dos compostos **4a-h**, fluconazol e anfotericina B frente a 44 isolados clínicos de *Candida*.

Linhagem testada n° URM	Composto (CFMs em µg/mL) ^a								Anf ^b	Flu ^c
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h		
<i>Candida albicans</i> 4990	1.600	1.600	1.600	200	400	800	1.600	1.600	0,25	>64
<i>C. albicans</i> 4987	1.600	1.600	1.600	200	400	800	1.600	1.600	0,25	16
<i>C. albicans</i> 4986	1.600	1.600	1.600	200	400	800	1.600	1.600	0,25	16
<i>C. albicans</i> 4820	1.600	1.600	1.600	800	800	800	1.600	1.600	0,5	4
<i>C. albicans</i> 4819	1.600	1.600	1.600	800	800	800	1.600	1.600	0,5	4
<i>C. albicans</i> 4817	1.600	1.600	1.600	800	800	800	1.600	1.600	0,5	4
<i>C. albicans</i> 4609	3.200	3.200	3.200	1.600	1.600	1.600	3.200	1.600	0,5	4
<i>C. albicans</i> 4606	3.200	3.200	3.200	1.600	1.600	1.600	3.200	1.600	0,25	2
<i>C. albicans</i> 4388	1.600	3.200	1.600	400	800	1.600	1.600	1.600	0,25	>64
<i>C. albicans</i> 4387	1.600	3.200	1.600	800	1.600	1.600	1.600	1.600	0,125	2
<i>C. albicans</i> 4386	1.600	3.200	1.600	400	800	1.600	1.600	1.600	0,25	1
<i>C. albicans</i> 4385	1.600	3.200	1.600	800	1.600	1.600	1.600	1.600	0,25	2
<i>C. albicans</i> 4384	1.600	3.200	1.600	800	1.600	1.600	1.600	1.600	0,06	2
<i>C. albicans</i> 4260	1.600	1.600	3.200	800	1.600	1.600	1.600	1.600	0,06	2
<i>C. albicans</i> 4127	1.600	1.600	3.200	800	1.600	1.600	1.600	1.600	0,25	0,5
<i>C. albicans</i> 4126	1.600	1.600	3.200	800	800	1.600	1.600	1.600	0,125	0,5
<i>C. albicans</i> 4125	1.600	1.600	3.200	400	800	800	1.600	1.600	0,06	0,5
<i>C. albicans</i> 4124	1.600	3.200	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	0,25	>64
<i>C. albicans</i> 3719	1.600	3.200	3.200	1.600	1600	1.600	3.200	1.600	2	64
<i>C. albicans</i> 3716	1.600	1.600	1.600	100	800	800	1.600	800	1	0,5
<i>C. krusei</i> 4802	1.600	1.600	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	2	64
<i>C. krusei</i> 4263	1.600	3.200	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	0,125	64
<i>C. krusei</i> 1059	1.600	1.600	3.200	100	1.600	1.600	3.200	1.600	0,125	16

<i>C. krusei</i> 934	1.600	3.200	3.200	1.600	1.600	1.600	3.200	1.600	2	64
<i>C. krusei</i> 109	1.600	1.600	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	0,5	16
<i>C. parapsilosis</i> 4984	1.600	1.600	1.600	200	400	800	1.600	1.600	0,25	16
<i>C. parapsilosis</i> 4970	1.600	1.600	1.600	200	400	800	1.600	1.600	0,25	16
<i>C. parapsilosis</i> 4889	1.600	1.600	1.600	800	800	800	1.600	800	0,25	2
<i>C. parapsilosis</i> 4818	1.600	1.600	1.600	800	800	800	1.600	1.600	0,5	4
<i>C. parapsilosis</i> 4804	1.600	1.600	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	0,5	8
<i>C. parapsilosis</i> 4608	1.600	3.200	3.200	800	1.600	800	3.200	1.600	1	16
<i>C. parapsilosis</i> 4607	1.600	3.200	3.200	800	1.600	800	3.200	1.600	0,5	4
<i>C. parapsilosis</i> 4261	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	0,125	>64
<i>C. parapsilosis</i> 3627	1.600	1.600	3.200	400	800	800	1.600	1.600	0,06	0,5
<i>C. parapsilosis</i> 3624	1.600	1.600	3.200	400	800	800	1.600	1.600	0,06	0,5
<i>C. parapsilosis</i> 3621	1.600	1.600	3.200	400	800	800	1.600	1.600	0,06	0,5
<i>C. parapsilosis</i> ^d	1.600	3.200	3.200	800	1.600	1.600	3.200	800	0,5	8
<i>C. tropicalis</i> 4790	1.600	3.200	3.200	1.600	1.600	1.600	3.200	1.600	1	32
<i>C. tropicalis</i> 4262	1.600	3.200	3.200	1.600	1.600	1.600	3.200	1.600	0,5	4
<i>C. tropicalis</i> 1150	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	0,25	>64
<i>C. tropicalis</i> 933	1.600	3.200	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	0,125	4
<i>C. tropicalis</i> 916	1.600	3.200	3.200	800	1.600	1.600	3.200	1.600	0,125	4
<i>Cryptococcus neoformans</i> 5811	800	1.600	1.600	100	200	800	1.600	800	0,25	0,5
<i>C. neoformans</i> 5980	800	1.600	1.600	100	200	800	1.600	800	0,25	0,5

^a O valor de CFM foi definido como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir totalmente o desenvolvimento da levedura. Os valores foram determinados em leitura após dois dias de incubação a 37 °C. O inóculo contém aproximadamente 2,5 x 10³ céls/mL. Meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). A concentração final dos tiofenos foi entre 6,25-3.200 µg/mL, 0,06-16 µg/mL para anfotericina B e 0,125-64 µg/mL para fluconazol.

^b Anfotericina B

^c Fluconazol

^d *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi usada como linhagem referência.

Os compostos **3a-g** não foram listados na Tabela 2, uma vez que não foi evidenciada nenhuma atividade antifúngica frente a todas as leveduras testadas até a maior concentração usada (3.200 µg/mL).

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que derivados cicloalquila **4a-h** foram ativos frente quase todos os fungos testados sob determinadas concentrações. Estes apresentaram uma moderada ou fraca atividade contra os isolados de *Candida* e de *Cryptococcus*. Contudo, **4a-h** inibiu o crescimento dos isolados de *C. neoformans* mais significativamente que os de *Candida*. Também foi observado que estes novos compostos apresentaram atividade fungicida e não fungistática contra todos as leveduras testadas.⁴⁸

Os derivados ciclopentila **4a-c** e cicloheptila **4g,h** apresentam perfis semelhantes de atividade antifúngica com CFM que variaram entre 1.600-3.200 µg/mL para leveduras do gênero *Candida* e 800-1.600 µg/mL para as cepas de *C. neoformans*, sendo em geral, de 2 a 8 vezes menos ativo que os derivados ciclohexila **4d-f**. O derivado 4-NO₂ **4d** exibiu a maior atividade, com valores de CFM de 2 a 8 vezes menores que os outros derivados ciclohexila **4e,f**. Este composto apresentou também valores de MFC entre 100-200 µg/mL em vários casos (Tabela 3, linhas 1, 2, 3, 20, 23, 26, 27, 43 e 44) enquanto que a anfotericina B e fluconazol tiveram valores de 0,25 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente.

De acordo com a avaliação das relações de estrutura-atividade (SAR), as posições 4 e 5 do anel de tiofeno parecem ter grande influência na atividade antifúngica. Substituição de 5-metil (**3a-g**) (compostos inativos) por radicais 4,5-cicloalquil (**4a-h**) torna os compostos ativos, sendo, portanto, essencial para a atividade antifúngica. Nos derivados cicloheptila **4g,h** a mudança do grupo *para*-clorofenil de **4h** aumenta em duas vezes sua atividade (em 50% dos casos). Em contraste, isto não foi observado para a série ciclopentila **4a-c**, e os compostos **4b** e **4c** com substituintes *para*-bromofenil e *para*-clorofenil, respectivamente, exibiram atividade inferior que o derivado não substituído **4a**. Os compostos **4d-f**, mais ativos, foram aqueles com ligação polimetileno [- (CH₂)₄ -]. Para estes derivados ciclohexila, **4d** com o grupamento nitro ligado ao C-4 do grupo de

fenil, exibiu o melhor perfil, seguido por **4e** (para-bromofenil) (2 vezes mais ativo que **4f** (4-Cl) em 25% dos casos, e 4 vezes mais ativo para os isolados de *Cryptococcus*).

Além da avaliação antifúngica, todos os compostos sintetizados foram avaliados em relação a sua atividade citotóxica contra células de baço de ratos BALB/c no ensaio de incorporação de ³H-timidina.⁴⁹ Este ensaio mede a incorporação de 3H-timidina nas células expostas ao composto testado e avalia a atividade de cada composto a cerca de sua habilidade em inibir a síntese de DNA.⁵⁰ Nesta avaliação citotóxica, foi verificado que todos os compostos testados não apresentam nenhum efeito citotóxico em concentrações inferiores a 1 µg/mL.

É possível concluir que uma série de novos derivados 2-(substituído-amino)-4,5-dialquil-tiofeno-3-carbonitrila **3a-g** e **4a-h** foram sintetizados com bons rendimentos (80-99%) e foram avaliados, de acordo com seu potencial antifúngico *in vitro* frente 42 isolados de *Candida* e dois isolados de *C. neoformans*. Em geral, os compostos expressaram potencial antifúngico *in vitro* moderado ou fraco, entretanto, quando avaliados em altas concentrações, estes foram fungicidas. Os isolados de *Cryptococcus* foram mais sensíveis que as leveduras de *Candida* para os novos derivados de tiofeno. Foi observado que a presença de grupos 4,5-cicloalquil (compostos **4a-h**) unidos ao anel de tiofeno é essencial para a atividade de antifúngica, e a mono-metilação sobre o C-5 resulta em compostos inativos (**3a-g**).

Entre eles, derivados ciclohexila 4d-f exibiram o melhor perfil de atividade antifúngica. O composto 4d foi o mais ativo entre eles, com valores da CFM variando entre 100-1.600 µg/mL. Os resultados sugerem que estes derivados, especialmente o derivado ciclohexila 4d-f, podem ser considerados promissores no desenvolvimento de novos agentes antimicóticos, especialmente para *C. neoformans*.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), UEPB, através do Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa/PRPGP e pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa a Reginaldo G. Lima-Neto. Agradecemos também a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF).

Referências e notas

1. Kontoyannis, D.; Mantidakis, E.; Samonis, G. *J. Hosp. Infect.* **2003**, *53*, 243.
2. Garber, G. *Drugs* **2001**, *61*, 1.
3. Brown, J.M. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2004**, *17*, 34.
4. Walsh, T.J.; Groll, A.H. *Transpl. Infect. Dis.* **1999**, *1*, 247.
5. Ampel, N.M. *Emerg. Infect. Dis.* **1996**, *2*, 109.
6. Goker, H.; Kus, C.; Boykin, D. W.; Yildiz, S.; Altanlar, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2589.
7. Rybak, M. J.; Akins, R. L. *Drugs* **2001**, *6*, 11.
8. Moudgal, V.; Little, T.; Bolkov, D.; Vazquez, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 767.
9. Hernandez, S.; Lopez-Ribot, J. L.; Najvar, L. K.; McCarthy, D. I.; Bocanegra, R.; Graybill, J. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1382.

10. Krogh-Madsen, M.; Arendrup, M. C.; Heslet, L.; Knudsen, J. D. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 938.
11. He, Y.; Wu, B.; Yang, J.; Robinson, D.; Risen, L.; Ranken, R.; Blyh, L.; Sheng, S.; Swayze, E. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3253.
12. Dupont, B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 31.
13. Baddley, J. W.; Moser, S. A. *Clin. Lab. Med.* **2004**, *24*, 721.
14. Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 501.
15. Perfect, J. R. *Oncology (Williston Park)* **2004**, *18*, 15.
16. Krcmery Jr., V. C. *Med. Princ. Pract.* **2005**, *14*, 125.
17. Fanos, V.; Cataldi, L.; *J. Chemother.* **2000**, *12*, 463.
18. Sheehan, D. J.; Hitchcock, C. A.; Sibley, C. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 40.
19. Foster, J. M.; Lartey, P. A. *Drug Discov Today* **2000**, *5*, 25.
20. Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; Werbovetz, K. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 797.
21. Gonzalez, J. L.; Stephens, C. E.; Wenzler, T.; Brun, R.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Barszcz, T.; Werbovetz, K. A.; Boykin, D. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 552.
22. Sharma, S.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1414.
23. Rando, D. G.; Doriguetto, A. C.; da Silva C. H. T. P.; Ellena, J.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Varanda, E. A.; Ferreira, E. I. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1196.
24. Fakhri, I. M. I.; Radwan, M. A. A.; El-Batran, S.; El-Salam O. M. E. A.; El-Shenawy, S. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *44*, 1718.
25. Meng, Q.; Slassi, A. Rakhit, S. U.S. Patent 5,770,742, **1998**.
26. Talley, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Collins, P. W.; Penning, T. D.; Reitz, D. B.; Rogers, R. S. U.S. Patent 7,030,153 B2, **2006**.
27. Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Pavani, M. G.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Fruttarolo, F.; Piccagli, L.; Jung, M. K.; Hamel, E.; Borgatti, M.; Gambari, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3906.
28. Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Carrion, M. D.; Cara, C. L.; Cruz-Lopez, O.; Preti, D.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Zonta, N.; Balzarini, J.; Brancale, A.; Sarkare, T.; Hamele, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5367.
29. Price, S.; Bordogna, W.; Bull, R. J.; Clark, D. E.; Crackett, P. H.; Dyke, H. J.; Gill, M.; Harris, N. V.; Gorski, J.; Lloyd, J.; Lockett, P. M.; Mullett, J.; Roach, A. G.; Roussel, F.; White, A. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 370.
30. Nair, M. G.; Abraham, A. U.S. Patent 5,260,296, **1993**.
31. Kim, S. H.; Tran, M. T.; Ruebsam, F.; Xiang, A. X.; Ayida, B.; McGuire, H.; Ellis, D.; Blazel, J.; Tran, C. V.; Murphy, D. E.; Webber, S. E.; Zhou, Y.; Shah, A. M.; Tsan, M.; Showalter, R. E.; Patel, R.; Gobbi, A.; LeBrun, L. A.; Bartkowski, D. M.; Nolan, T. G.; Norris, D. A.; Sergeeva, M. V.; Kirkovsky, L.; Zhao, Q.; Han, Q.; Kissinger, C. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4181.
32. Bonini, C.; Chiummiento, L.; De Bonis, M.; Funicello, M.; Lupattelli, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2797.
33. Pinto, E.; Queiroz, M.-J. R. P.; Vale-Silva, L. A.; Oliveira, J. F.; Begouin, A.; Begouin, J.-M.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8172.
34. Fokialakis, N.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O.; Skaltsounis, A. L.; Wedge, D. E. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1651.
35. Chobot, V.; Buchta, V.; Jahodářová, H.; Pour, M.; Opletal, L.; Jahodář, L.; Harant, P. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 288.
36. Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Estevinho, L. M.; Queiroz, M.-J. R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5831.

37. Ryu, C.-K.; Lee, S.-K.; Han, J.-Y.; Jung, O.-J.; Lee, J. Y.; Jeong, S. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2617.
38. Gewald, K. *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 3571.
39. Sridhar, M.; Rao, R. M.; Baba, N. H. K.; Kumbhare, R.M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3171.
40. *Procedimento representativo para (3a-g).* 2-[(2-Nitro-benzilideno)-amino]-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila (**3a**). Mistura reacional contendo quantidades equimolares de **1** (3,30 mmol) e 2-nitro-benzaldeído (3,30 mmol) em etanol 5 mL e 5 gotas de ácido acético foram agitados sob refluxo durante 2 horas e posteriormente resfriados a temperatura ambiente. 50mL de água foram adicionados e o sólido precipitado foi filtrado sob vácuo, lavado com água e seco em dessecador, fornecendo **4a**. RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 2.46 (3H, d, J = 1.2 Hz, CH₃), 7.18 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-4), 7.82 (1H, dt, J = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H), 7.92 (1H, dt, J = 7.8, 1.5 Hz, Ar-H), 8.15 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H), 8.20 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H), 8.93 (1H, s, CH=N); Analisado para C₁₃H₉N₃O₂S. Calculado (%): C, 57.55; H, 3.34; N, 15.49; S, 11.84. Encontrado (%): C, 57.58; H, 3.55; N, 15.40; S, 11.68.
41. *Procedimento típico: preparação de 2-[(4-cloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (4f)* Mistura reacional contendo quantidades equimolares de **2b** (3,30 mmol) e 4-cloro-benzaldeído (3,30 mmol) em etanol 10 mL e 5 gotas de ácido acético foram agitados sob refluxo durante 90 minutos e posteriormente esfriados a temperatura ambiente. 50mL de água foram adicionados e o sólido precipitado foi filtrado sob vácuo, lavado com água e seco em dessecador, fornecendo **4f**. RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 1.84 (m, 4H, CH₂), 2.66 (m, 4H, CH₂), 7.41 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.84 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar), 8.33 (s, 1H, CH=N). Analisado para C₁₆H₁₃ClN₂S. Calculado (%): C, 63.98; H, 4.36; N, 9.33; S, 10.65. Encontrado (%): C, 64.08; H, 4.39; N, 9.32; S, 10.48.
42. *Procedimento experimental:* Solventes e reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e foram purificados de maneira usual. Os compostos **1** e **2a-c** foram preparados de acordo com procedimentos previamente descritos.^{38,39} Todas as reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (TLC) de sílica gel GF₂₅₄ marca Merck. Pontos de fusão foram determinados por um aparelho Büchi-535 e não são corrigidos. A análise elementar foi realizada em um analisador Carlo Erba EA1110. Contador de beta-radiação (β-matrix 9600, Packard). Os espectros de RMN foram obtidos num espectômetro Varian Unity Plus 300 MHz utilizando tetrametilsilano como referência interna. Deslocamentos químicos foram descritos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram descritas em hertz. Os sinais foram designados como: s, simples; d, duplo; dd, duplo dupletos; m, multipletos; b, largo.
43. CLSI, CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-second edition M27-A2. Wayne, PA, **2002**.
44. NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Method M27-A2, 2nd ed., Wayne Ed.; **2002**, 22, 1.
45. *Atividade antifúngica:* os testes de atividade antifúngica *in vitro* dos compostos foram realizados com o método da microdiluição em caldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁴⁴. Todos os isolados tem sido estocados em óleo mineral a 18 °C. Testes de viabilidade e subsequente confirmação taxonômica foram realizados de acordo com BARNETT et al.⁴⁷ e HOOG et al.⁴⁸ Como objetivo de obter inóculo com 2,5x10³ céls/mL, cada isolado foi repicado em ágar Sabouraud adicionado de extrato de levedura a 35 °C por dois dias. Ajuste foi realizado em espectrofotômetro a 530 nm com transmitância de 90%. Soluções estoques foram preparadas e dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), alicotados e estocados a -20 °C na concentração final de 32.000 µg/mL. Diluições decimais destas soluções estoques do tiofeno foram preparadas em RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a concentração final de 0,165 mol/L e pH 7,0. A concentração final de inóculo das leveduras será de (1,5 ± 1,0)10³ UFC/mL. Dois poços controles, isentos de antifúngico e levedura, foram incluídos no ensaio. A concentração fungicida mínima (CFM), será a menor concentração capaz de impedir o crescimento visível dos isolados testados, em relação ao poço controle.
46. Barnett, J. A.; Paire, R. W.; Yarrow, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press, **2000**.
47. Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, **2000**.

48. *Atividade fungicida*: poços que não apresentaram crescimento fúngico (no teste de atividade antifúngica), tiveram seus conteúdos recultivados (em placas de Petri contendo ágar Sabouraud), onde não foi re-obtida nenhuma cultura fúngica original.
49. *Citotoxicidade in vitro*: A citotoxicidade dos novos compostos sintetizados foi avaliada frente a células de baço oriundas de camudongos isogênicos BALB/c. a viabilidade das células expostas ao teste foi determinada pelo ensaio de exclusão de células coradas pelo azul de *Trypan*.⁵⁰ Foi preparada uma suspensão de células em meio de cultura completo (meio de cultura Eagle modificado por Dubelcco adicionado com soro bovino fetal a 10%, FCS, Cultilab, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brasil) fornecendo um total de 5×10^6 células por poço. Para a determinação da concentração não-tóxica, soluções estoque dos compostos **3a-g** e **4a-h** foram preparadas em DMSO estéril e cada compostos foi avaliado em 5 diferentes concentrações (100, 50, 25, 10 e 1 µg/ml) em triplicata. Poços contendo: apenas células de baço em meio de cultura, células com saponina (0.05%) (produto com conhecida atividade citotóxica) e células com DMSO (1%), todos contendo timidina tritiada (1 µCi/poço) foram utilizadas em todas as placas como controle. Os meios foram incubados na presença de timidina tritiada (1 µCi/poço) por 24 h em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Depois desse período, o conteúdo de cada das placas foi colhida de modo a determinar a incorporação de ³H-timidina utilizando um contador de beta-cintilação (modelo β-matrix 9600, Packard). A citotoxicidade dos compostos foi determinada por comparação da porcentagem de incorporação de ³H-timidina (indicador da viabilidade celular) dos poços droga-tratados em relação aos poços não tratados. Concentrações atóxicas foram definidas como as que causaram uma redução na incorporação de ³H-timidina menor que 30% em comparação as células não tratadas (controle).
50. Freshner, R. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1987; p 117.

**4 SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE
DERIVADOS TRIAZÓLICOS CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA***

Artigo a ser submetido para:

European Journal of Medicinal Chemistry

Síntese e atividade antifúngica *in vitro* de derivados triazólicos contra espécies de *Candida*

Reginaldo G. Lima-Neto^a; Janaína V. dos Anjos^{b,*}; Rajendra M. Srivastava^b; Francisco J. B. Mendonça Junior^c; Rejane P. Neves^a

^a Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil.

^b Departamento de Química Fundamental, UFPE, Recife, Brazil.

^c Laboratório de Síntese e Vetorização de substâncias Bioativas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa 58020-540, Brazil

*Autor Correspondente: Janaína Versiani dos Anjos
Tel: + 55 81 2126 7411 Fax: + 55 81 2126 8480
E-mail: janaversiani@hotmail.com

Resumo

1,2,3-triazóis têm sido extensivamente estudados como compostos com importantes atividades biológicas. Neste trabalho, descrevemos a síntese de dez 2-[1-aryl-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propano-2-ol através da cicloadição azida-alquino cobre catalisada ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ou “click chemistry”). Estes derivados triazólicos tiveram sua atividade antifúngica *in vitro* avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra 42 isolados de quatro diferentes espécies de *Candida*. Dentre os compostos testados, o derivado triazólico halógeno substituído, 2-[1-(4-clorofenil)-1*H*-(1,2,3) triazol-4-yl]-propano-2-ol, apresentou o melhor perfil antimicótico, o qual pode ser usado no futuro para a terapia de infecções fúngicas.

Palavras-chave: *Candida* spp., atividade antifúngica, triazóis, halogênio.

1 Introdução

Infecções fúngicas profundas e superficiais têm aumentado significativamente nas últimas décadas. O controle das doenças fúngicas tem se mostrado difícil por causa dos vários fatores de risco. O número de pacientes em alto risco para essas infecções tem aumentado principalmente em pacientes imunocomprometidos devido a aids, transplante de órgãos, quimioterapia ou outros procedimentos invasivos [1]. Portanto, existe uma clara necessidade para o desenvolvimento de agentes terapêuticos antimicóticos efetivos para o tratamento de infecções fúngicas, uma vez que a maioria das drogas antifúngicas disponíveis tem apresentado relatos de resistência no uso clínico [2,3]. Entre elas, os azóis são a classe de compostos mais utilizados, devido a seu amplo espectro, alta potência e baixa toxicidade [4].

Os azóis são inibidores competitivos do lanosterol 14 α -demetilase (uma enzima citocromo P-450), levando à diminuição da biossíntese fúngica do ergosterol, que é um composto-chave da membrana celular do fungo, prevenindo, dessa forma, o crescimento desses patógenos [5]. Além das propriedades antifúngicas [6,7,8], compostos triazólicos também possuem uma grande variedade de atividades biológicas associadas, tais como antibacteriana e anti-tuberculose [9,10,11,12,13,14,15], anticancerígena [16,17] e analgésica [18].

Considerando-se as vantagens acima mencionadas das drogas antifúngicas contendo os núcleos triazóis e o crescimento dos mecanismos de resistência à drogas nesse tipo de microrganismo, decidimos sintetizar 2-[1-*arila-1H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol capaz de inibir o crescimento celular de algumas espécies de *Candida* com relevância clínica, usando o método de microdiluição em caldo.

2 Protocolos experimentais

2.1 Síntese

Todos os reagentes disponíveis comercialmente foram utilizados sem purificação adicional e as reações foram monitoradas por análise CCD (Placas CCD GF₂₅₄ E. Merck). Pontos de fusão foram determinados em um aparelho Büchi e não foram corrigidos. A cromatografia em coluna foi realizada em Silica Gel 60 (70-230 mesh, E. Merck). Os espectros RMN foram realizados com um espectrometro Bruker AC-200 MHz e foram referenciados do seguinte modo: ¹H (200 MHz), SiMe₄ interno a δ = 0,00 ppm, ¹³C

(50 MHz), padrão interno a $\delta = 77,23$ ppm. As medidas da massa exatas dos íons moléculares foram obtidas em um Eletrospray Shimadzu LC/MS-IT-TOF.

Síntese das azidas aromáticas (2a-j). Foram adicionados 30 mL de HCl 6N a 0 °C à uma solução de anilina (**1a-j**, 4,1 mmol) dissolvida em in CH₂Cl₂ (30 mL). Uma solução aquosa saturada de NaNO₂ (10 mL) foi adicionada, gota a gota, a esse sistema bifásico. Após agitar durante 30 minutos a 0 °C, foi adicionado NaN₃ (0,53g, 8,2 mmol) a 0 °C. A agitação foi continuada por 30 minutos, em seguida a solução foi aquecida naturalmente à temperatura ambiente. As duas fases foram separadas, e a fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 50mL). As fases orgânicas foram unidas, lavadas com solução aquosa de NaHCO₃, em seguida secas (Na₂SO₄) e filtradas sob carvão ativado. A evaporação do solvente sob vácuo originou a azida bruta, utilizada no próximo passo, sem nenhuma purificação adicional.

Síntese de 2-[1-aril-1H-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4a-j). 2-Metil-but-3-in-2-ol (3, 1,1 mmol) e o composto de azida (2a-j, 1 mmol) foram suspensos em uma mistura 1:1 de CH₂Cl₂ e água (10 mL). Foi adicionada a essa solução uma mistura de Cu(OAc)₂ (36 mg, 0,2 mmol) e ascorbato de sódio (79 mg, 0,4 mmol). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente até a CCD indicar a extinção completa da azida. A mistura foi diluída com CH₂Cl₂ (5 mL) e água (5 mL). A fase orgânica foi separada, e a fase aquosa foi novamente extraída com CH₂Cl₂ (5 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre Na₂SO₄. A remoção do solvente sob vácuo originou um resíduo que foi recristalizado em clorofórmio:hexano gerando o triazol correspondente (**4a-j**).

2-[1-fenil-1H-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4a): cristais brancos; rendimento 86%; p.f.: 95-96°C; *R_f* 0,60 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,97 (s, 6H, 2 CH₃); 2,92 (bs, 1H, OH); 6,73 (m, 3H, H_{arom}); 6,93 (dd, 1H, *J* = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H_{arom}); 6,97 (dd, 1H, *J* = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H_{arom}); 7,24 (s, 1H, H_{triazol}). ¹³C RMN (CDCl₃): δ 30,3; 68,5; 117,7; 120,4; 128,5; 129,6; 136,9; 156,4. ESI-HRMS Calcd para C₁₁H₁₃N₃ONa [M + Na]⁺: 226,0956. Encontrado: 226,0911.

2-[1-(4-Tolil)-1H-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4b): cristais brancos; rendimento 78%; p.f.: 120-121°C; *R_f* 0,65 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,99 (s, 6H, 2 CH₃); 1,68 (s, 3H, CH₃_{arom}); 3,13 (bs, 1H, OH); 6,54 (bd, 2H, *J* = 8,0 Hz, H_{arom}); 6,85 (bd, 2H, *J* = 8,0 Hz, H_{arom}); 7,24 (s, 1H, H_{triazol}). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 20,9; 30,4; 68,4; 117,7; 120,2; 130,0; 134,6; 138,5; 156,2. ESI-HRMS Calcd para C₁₂H₁₅N₃ONa [M + Na]⁺: 216.2591. Encontrado: 216,7793.

2-[1-(4-Clorofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4c): cristais brancos; rendimento 67%; p.f.: 93-94°C; R_f 0,67 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ^1H (CDCl_3): δ 0,98 (s, 6H, 2 CH_3); 2,90 (bs, 1H, OH); 6,75 (dd, 2H, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, H_{arom}); 6,93 (dd, 2H, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, H_{arom}); 7,24 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 30,3; 68,5; 107,1; 117,6; 121,5; 129,7; 134,2; 135,4; 156,6. ESI-HRMS Calcd para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 260,0567. Encontrado: 260,0518.

2-[1-(4-Bromofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4d): cristais brancos; rendimento 96%; p.f.: 95-96°C; R_f 0,68 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,70 (s, 6H, 2 CH_3); 3,68 (bs, 1H, OH); 7,59 (m, 4H, H_{arom}); 7,97 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 30,3; 68,4; 107,0; 121,7; 122,1; 132,7; 135,8; 156,7. ESI-HRMS Calcd para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrN}_3\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 305,1263. Encontrado: 305,9989.

2-[1-(4-Metoxifenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4e): cristais vermelhos; rendimento 69%; p.f.: 106-107°C; R_f 0,65 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,67 (s, 6H, 2 CH_3); 3,00 (bs, 1H, OH); 3,82 (s, 3H, OCH_3); 6,96 (dd, 2H, $J = 6,0$ Hz, 4,0 Hz, H_{arom}); 7,57 (dd, 2H, $J = 6,0$ Hz, 4,0 Hz, H_{arom}); 7,81 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 30,4; 55,5; 68,5; 114,6; 122,1; 130,5; 159,6. ESI-HRMS Calcd para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 256,2562. Encontrado: 256,1010.

2-[1-(3-Nitrofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4f): cristais brancos; rendimento 75%; p.f.: 98-100°C; R_f 0,60 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,63 (s, 6H, 2 CH_3); 3,96 (bs, 1H, OH); 7,65 (bd, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{arom}); 8,12 (m, 2H, H_{arom}); 8,16 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$); 7,65 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H_{arom}). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 30,2; 68,4; 114,9; 122,9; 125,8; 130,8; 137,5; 148,6; 157,1. ESI-HRMS Calcd para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 271,2278. Encontrado: 271,0764.

2-[1-(4-Nitrofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4g): cristais amarelos; rendimento 58%; p.f.: 123-124°C; R_f 0,63 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,69 (s, 6H, 2 CH_3); 2,82 (bs, 1H, OH); 7,95 (dd, 2H, $J = 6,0$ Hz, 4,0 Hz, H_{arom}); 8,03 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$); 8,37 (dd, 2H, $J = 6,0$ Hz, 2,0 Hz, H_{arom}). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 30,4; 68,7; 107,1; 120,3; 125,5; 141,2; 147,0; 157,2. ESI-HRMS Calcd para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 265,2453. Encontrado: 265,1469.

2-[1-(3,4-Dimetilfenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4h): cristais amarelos; rendimento 31%; p.f.: 128-129°C; R_f 0,80 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,00 (s, 6H, 2 CH_3); 1,60 (s, 6H, 2 CH_3); 2,69 (bs, 1H, OH); 6,53 (m, 1H, H_{arom}); 6,72 (dd, 2H, $J = 8,1$ Hz, 2,0 Hz, H_{arom}); 7,19 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$). RMN ^{13}C

(CDCl₃): δ 19,3; 19,8; 30,4; 68,5; 107,1; 117,7; 121,5; 130,4; 134,9; 137,2; 138,1; 156,0. ESI-HRMS Calcd para C₁₃H₁₇N₃ONa [M + Na]⁺: 254,2833. Encontrado: 254,1229.

2-[1-(α -Naftil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4i): cristais vermelhos; rendimento 62%; p.f.: 152-153°C; *R_f* 0,65 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,75 (s, 6H, 2 CH₃); 3,00 (sl, 1H, OH); 7,54 (m, 5H, H_{arom}); 7,82 (s, 1H, H_{triazol}); 7,95 (m, 3H, H_{arom}). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 30,5; 68,6; 122,3; 123,5; 127,0; 128,2; 128,5; 130,3; 133,7; 134,0; 155,5. ESI-HRMS Calcd para C₁₅H₁₅N₃ONa [M + Na]⁺: 276,2889. Encontrado: 276,1070.

2-[1-(β -Naftil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (4j): cristais amarelos; rendimento 60%; p.f.: 143-144°C; *R_f* 0,68 (acetato de etila:clorofórmio 9:1, v/v). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,72 (s, 6H, 2 CH₃); 2,97 (bs, 1H, OH); 7,53 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{arom}); 7,89 (m, 4H, H_{arom}); 8,03 (s, 1H, H_{triazol}); 8,12 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz, H_{arom}). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 30,4; 68,6; 118,3; 118,9; 126,9; 127,3; 127,8; 128,2; 129,9; 132,7; 133,1; 134,4; 155,6. ESI-HRMS Calcd para C₁₅H₁₅N₃ONa [M + Na]⁺: 276,2889. Encontrado: 276,1071.

2.2 Linhagens e métodos de crescimento

Vinte linhagens de *Candida albicans*, cinco de *C. krusei*, onze de *C. parapsilosis* e cinco de *C. tropicalis* foram fornecidas pela Coleção de Culturas – Micoteca URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. As linhagens foram preservadas em óleo mineral a 18 °C [19]. Foram efetuados testes de viabilidade em todas as linhagens e a subsequente confirmação taxonômica de suas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas [20]. Na Tabela 1, estão apresentados: espécies, números de registro, ano de estoque e substrato de isolamento. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizado como referência de linhagem.

2.3 Sensibilidade antifúngica in vitro

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 [21]. Os derivados triazólicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e então as soluções estoques foram congeladas a -80°C. As concentrações testadas variaram entre 2 a 2.048 µg.mL⁻¹. Fluconazol foi utilizado como fármaco de referência em concentrações variando de 0,125 a 64 µg.mL⁻¹.

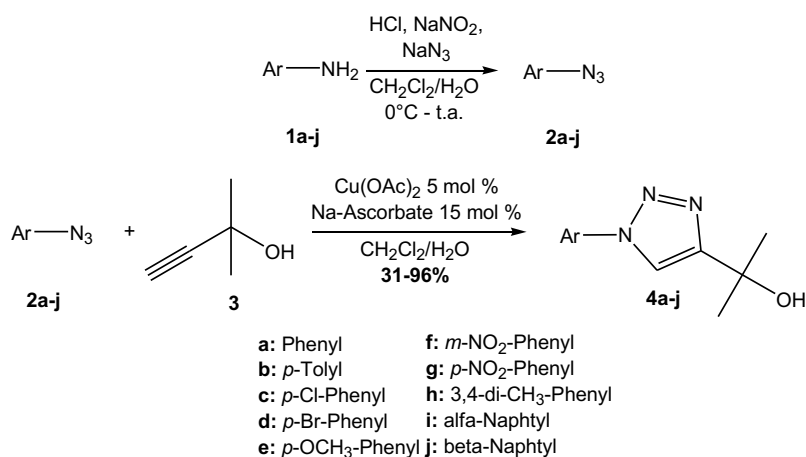
Para obter um inóculo fúngico contendo $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, cada isolado foi cultivado em tubo de ensaio contendo 20 mL de meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco) adicionado de extrato de levedura e incubadas a 35 °C por 48 horas. Posteriormente, suspensões das leveduras foram preparadas solução salina esterilizada (0,85%) e mantidas a 28 ± 2 °C, para então serem ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. Sequencialmente, duas diluições seriadas de 1:100 e 1:20 foram feitas para obter um inóculo final de $1,0 \times 10^3$ e 5×10^3 UFC/mL.

Os poços contendo 100 µL da diluição seriada da molécula teste ou com o fármaco referência em RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO), com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich) foram adicionados com 100 µL de inóculo. Após inoculação as placas foram incubadas a 35 °C e foram lidas visualmente após 48 horas. CIMs correspondeu a menor concentração capaz de droga que inibiu o crescimento do isolado comparado ao poço controle. Cada experimento foi realizado em triplicata.

3 Resultados

3.1 Química

Antes da síntese do 2-[1-aryl-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propano-2-ol, as azidas aromáticas (**2a-j**) foram preparadas por meio das anilinas correspondentes (**1a-j**), seguindo as condições de Malolanarasimhan [22]. As azidas aromáticas foram, em seguida, reagidas com 2-metil-but-3-yn-2-ol (**3**) utilizando-se $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ e ascorbato de sódio como catalisador em 1:1 diclorometano:água para dar os produtos **4a-j** em bons rendimentos (Esquema) [23,24].



Esquema

Para todas as moléculas sintetizadas, apenas um regioisômero pôde ser detectado pelo RMN ^1H . Apenas um singlete foi observado no espectro RMN ^1H para o anel triazólico (δ 7,19 – 8,16 ppm), que pode ser atribuído ao próton na posição C-5 do núcleo triazólico. Desse modo, de acordo com a literatura prévia para as reações de cicloadição de cobre catalizadas [25,26], acreditamos que os produtos obtidos são 1,4-regioisômeros.

3.2 Biologia

Para cada experimento, os inóculos controles produziram um crescimento claramente detectável após o período de incubação determinado, indicando que todos os isolados eram viáveis e que as condições utilizadas eram apropriadas para o crescimento fúngico.

Os resultados antifúngicos obtidos pelo CIM estão resumidos na Tabela 2. A maioria dos 1,2,3-triazóis sintetizados apresentaram atividade fraca (**4a,b,d,e,f**) ou ausente (**4g,h,i,j**) contra as espécies de *Candida* utilizadas. Contudo, para o 2-[1-(4-clorofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol (**4c**) e para a droga referência (fluconazol), foi possível determinar a CIM para os isolados de *Candida* avaliados. Como pode ser visto, o fluconazol mostrou atividade fungistática em concentrações variando de 0,5 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Oito isolados (4987, 4986, 4984, 4970, 4790, 4608, 1059 e 109) tiveram seu crescimento inibido no padrão dose-dependente, apresentando valores variando de 16 a 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em contraste a esses achados, nove isolados (4990, 4802, 4388, 4263, 4261, 4124, 3719, 1150 e 934) foram resistentes ao fluconazol, mostrando valores de CIM acima de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pode-se também ser observado que o triazol **4c** mostrou boa atividade fungicida, apresentando valores variando de 64 a 256 $\mu\text{g/mL}$ contra todas as espécies testadas.

Ao se observar a estrutura da droga, pode ser percebido que esse composto possui um átomo de cloro substituído na posição *para* do radical fenil presente na posição N-1 do núcleo triazólico. Anéis contendo cloro como substituintes são importantes para a atividade antifúngica, como já relatado por Wang e colaboradores [27]. Em seu estudo, dezesseis *N*-metil-substituído fenoxibutano-1-amina cloro substituídos exibiram forte atividade fungicida *in vitro*, sendo mais ativos contra os microrganismos testados que a droga referência utilizada, voriconazol. Mais tarde, Wang et al. [28] decidiram sintetizar catorze novos triazóis substituídos com um grupo fenoxialquil. Eles observaram também que as melhores drogas antifúngicas foram aquelas com átomos de halogênios substituídos nos radicais fenil.

4 Conclusão

Para concluir, uma série de análogos 1,2,3-triazóis com dez diferentes substituintes na posição *N*-1 do anel triazólico foi sintetizada e avaliada quanto sua atividade antifúngicos. Todos os compostos foram testados contra 42 isolados patogênicos de quatro diferentes espécies de *Candida*. A modificação dos substituintes tiveram um grande impacto nos valores de concentração mínima inibitória, uma vez que obtivemos derivados triazólicos sem atividade antimicótica (**4a,b,d,e,f**), com atividade antifúngicos moderada (**4g,h,i,j**) e apenas um composto (**4c**) com boa atividade. Os dados dos testes antifúngicos mostraram que o derivado triazólico cloro substituído exibiu, em particular, boa inibição do crescimento fúngico, demonstrando que modificações adicionais nas séries 2-[1-(aril)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il] podem ser realizadas a fim de se obter protótipos mais potentes.

Referências Bibliográficas

- [1] R. Lopez-Martinez, Clin. Dermatol. 28 (2010) 178–184.
- [2] A. Chen, J.D. Sobel, Expert. Opin. Emerg. Drugs. 10 (2005) 21–33.
- [3] M.J. Rybak, R.L. Akins, Drugs 6 (2001) 11.
- [4] D.J. Sheehan, C.A. Hitchcock, C.M. Sibley, Clin. Microbiol. Rev. 12 (1999) 40–79.
- [5] Q.L. Wei, S.S. Zhang, J. Gao, W.H. Li, L.Z. Xu, Z.G. Yu, Biol. Med. Chem. 14 (2006) 7146–7153.
- [6] H.L. Hoffman, E.J. Ernst, M.E. Klepser, Expert. Opin. Invest. Drugs 9 (2000) 593–605.
- [7] N. Ulusoy, A. Gursoy, G. Otuk, Farmaco 56 (2001) 947–952.
- [8] N. Demirbas, A. Demirbas, S.A. Karaoglu, Bioorg. Khim. 31(2005) 430–440.
- [9] G.B. Bagihalli, P.G. Avaji, S.A. Patil, P.S. Badami, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 2639–2649.
- [10] M.S. Karthikeyan, D.J. Prasad, B. Poojary, K.S. Bhat, B.S. Holla, N.S. Kumari, Bioorg. Med. Chem. 14 (2006) 7482–7489.
- [11] K. Dabak, O. Sezer, A. Akar, O. Anac, Eur. J. Med. Chem. 38 (2003) 215–218.
- [12] W. Monika, M. Swatko-Ossor, L. Mazur, Z. Rzaczyńska, A. Siwek, J. Hetrocyclic Chem. 45 (2008) 1893–1896.
- [13] S. Joshi, N. Khosla, P. Tiwari, Bioorg. Med. Chem. 12 (2004) 571–576.
- [14] I. Küçükgülzel, S.G. Küçükgülzel, S. Rollas, M. Kirazb, Biorg. Med. Chem. Lett. 11 (2001) 1703–1707.

- [15] V. Klimesova, L. Zahajska, K. Waisser, J. Kaustova, U. Mollmann, *Farmaco* 59 (2004) 279–288.
- [16] S. Danoun, G. Baziard-Mouysset, J. Stigliani, M. Payard, M. Selkti, B. Viossat, A. Tomas, *Heterocyclic Commun.* 4 (1998) 45–51.
- [17] B.S. Holla, B. Veerendra, M.K. Shivanada, B. Poojary, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 759–767.
- [18] G. Turan-Zitouni, Z.A. Kaplancikli, K. Erol, F.S. Kilic, *Farmaco* 54 (1999) 218–223.
- [19] A.F. Sherf, *Phytopathology* 31 (1943) 30–32.
- [20] G.S. Hoog, J. Guarro, J. Gene, M.J. Figueras, *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Utrecht, Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- [21] CLSI. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- [22] Malolanarasimhan, K.; Lai, C. C.; Kelley, J. A.; Iaccarino, L.; Reynolds, D.; Young, H. A.; Marquez, V. E. *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 2717-2722.
- [23] Lee, B.Y.; Park, S. R.; Jeon, H. B.; Kim, K. S. *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 5105–5109.
- [24] dos Anjos, J.V.; Sinou, D.; de Melo, S.J.; Srivastava, R.M. *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 2440-2449.
- [25] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, H.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 210-216.
- [26] dos Anjos, J. V.; Neves Filho, R. A. W. ; Nascimento, S.C. ; Srivastava, R. M.; Melo, S. J. ; Sinou, D. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3571-3576.
- [27] W. Wang, C. Sheng, X. Che, H. Ji, Y. Cao, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5965–5969.
- [28] W. Wang, S. Wang, Y. Liu, G. Dong, Y. Cao, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, C. Sheng, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 6020–6026.

Tabela 1. Isolados de *Candida* estudados.

Espécies	Accession nº (URM)	Estocagem (em anos)	Substrato de isolamento
<i>C. albicans</i>	4990	01	Secreção vaginal
<i>C. albicans</i>	4987	01	Secreção vaginal
<i>C. albicans</i>	4986	01	Secreção vaginal
<i>C. albicans</i>	4820	02	Escamas ungueais
<i>C. albicans</i>	4819	02	Escamas ungueais
<i>C. albicans</i>	4817	02	Escamas ungueais
<i>C. albicans</i>	4609	03	Sangue
<i>C. albicans</i>	4606	03	Sangue
<i>C. albicans</i>	4388	05	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	4387	05	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	4386	05	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	4385	05	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	4384	05	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	4260	05	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	4127	07	Escamas inguinal
<i>C. albicans</i>	4126	07	Urina
<i>C. albicans</i>	4125	07	Escarro
<i>C. albicans</i>	4124	07	Secreção orofaríngea
<i>C. albicans</i>	3719	10	Dentina
<i>C. albicans</i>	3716	10	Dentina
<i>C. krusei</i>	4802	02	*
<i>C. krusei</i>	4263	05	Secreção orofaríngea
<i>C. krusei</i>	1059	48	*
<i>C. krusei</i>	934	49	Biópsia de apêndice
<i>C. krusei</i>	109	52	*
<i>C. parapsilosis</i>	4984	01	Secreção vaginal
<i>C. parapsilosis</i>	4970	01	Secreção vaginal
<i>C. parapsilosis</i>	4889	02	Sangue
<i>C. parapsilosis</i>	4818	02	Escamas ungueais
<i>C. parapsilosis</i>	4804	02	IFM
<i>C. parapsilosis</i>	4608	03	Sangue
<i>C. parapsilosis</i>	4607	03	Sangue
<i>C. parapsilosis</i>	4261	05	Secreção orofaríngea
<i>C. parapsilosis</i>	3627	12	Escarro
<i>C. parapsilosis</i>	3624	12	Escarro
<i>C. parapsilosis</i>	3621	12	Escarro
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC22019	-	-
<i>C. tropicalis</i>	4790	02	Farinha de mandioca
<i>C. tropicalis</i>	4262	06	Secreção orofaríngea
<i>C. tropicalis</i>	1150	46	Língua
<i>C. tropicalis</i>	933	49	Secreção vaginal
<i>C. tropicalis</i>	916	49	Fezes

*Substrato não identificado

Tabela 2. Atividade antifúngica dos derivados triazólicos **4a-j** e fluconazol contra os isolados de *Candida* estudado.

Isolados testado n° URM	Compostos (CIMs em µg/mL) ^a										Flu ^b
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4i	4j	
4990	2.048	1.024	256	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	>64
4987	2.048	1.024	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	16
4986	2.048	1.024	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	16
4820	2.048	1.024	256	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	4
4819	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	4
4817	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	4
4609	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	4
4606	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	2
4388	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	>64
4387	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	2
4386	2.048	1.024	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	1
4385	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	2
4384	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	2
4260	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	2
4127	R	1.024	128	1.024	2.048	2.048	R	R	R	R	0,5
4126	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	0,5
4125	2.048	1.024	256	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	0,5
4124	2.048	1.024	256	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	>64
3719	R	1.024	256	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	64
3716	R	1.024	256	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	0,5
4802	2.048	2.048	256	2.048	1.024	R	R	R	R	R	64
4263	2.048	2.048	256	2.048	1.024	R	R	R	R	R	64
1059	2.048	1.024	64	512	1.024	2.048	R	R	R	R	16
934	2.048	2.048	256	2.048	1.024	R	R	R	R	R	64
109	2.048	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	16
4984	R	2.048	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	16
4970	R	2.048	128	1.024	512	2.048	R	R	R	R	16
4889	R	1.024	64	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	2
4818	R	2.048	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	4
4804	R	2.048	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	8
4608	R	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	16
4607	R	1.024	128	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	4
4261	R	2.048	256	1.024	1.024	R	R	R	R	R	>64
3627	2.048	1.024	64	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	0,5
3624	2.048	1.024	64	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	0,5
3621	2.048	1.024	64	1.024	1.024	2.048	R	R	R	R	0,5
22019 ^c	R	2.048	256	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	8
4790	R	2.048	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	32
4262	R	1.024	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	4
1150	R	2.048	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	>64
933	R	2.048	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	4
916	R	2.048	128	2.048	1.024	2.048	R	R	R	R	4

^a O valor de CFM foi definido como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir totalmente o desenvolvimento da levedura. Os valores foram determinados em leitura após dois dias de incubação a 37 °C. O inoculo contém aproximadamente 2,5 x 10³ céls/mL. Meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). A concentração final dos tiofenos foi entre 2-2.048 µg/mL e 0,125-64 µg/mL para fluconazol.

^bFluconazol

^c*Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi usada como linhagem referência.

R=Resistência

**5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UM NOVO DERIVADO
TRIAZÓLICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS FRENTE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA***

Artigo a ser submetido para:

European Journal of Pharmaceutics Sciences

Avaliação *in vitro* e *in vivo* de um novo derivado triazólico encapsulado em lipossomas frente isolados clínicos de *Candida*

Reginaldo G. Lima-Neto^a; Rejane P. Neves^a; Janaína V. Anjos^b; Isabella M. F. Cavalcanti^c; Milena S. Ferraz^e, Almir G. Wanderley^d; Nereide S. Santos-Magalhaes^{c,*}

^a Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil.

^b Departamento de Química Fundamental, UFPE, Recife, Brazil.

^c Laboratório de Imunopatologia Keiso-Azami, UFPE, Recife, Brazil.

^d Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE, Recife, Brazil

Resumo

A atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de 2 - [1 - (4-clorofenil)-1*H*-(1,2,3) triazol-4-il]-propan-2-ol (TZL) e formulação lipossomal que contém este triazol encapsulado (TZL-Lipo) foram avaliados frente a isolados clínicos de *Candida*. Vesículas lipossomais foram preparados pela redispersão de filme lipídico. A estabilidade das formulações TZL-Lipo foram estudados através de testes de estabilidade acelerada e de longa duração. A concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* de TZL e TZL-Lipo frente 42 espécies de *Candida* foi determinada. A fim de avaliar a eficácia da nova formulação, TZL-Lipo foi administrados intraperitonealmente aos animais neutropênicos, em um modelo experimental de candidíase utilizando fluconazol como droga de referencia. Os perfis antifúngicos foram avaliados de acordo com os resultados dos testes *in vitro*, *in vivo* e avaliação de amostras de sangue dos animais. Os melhores resultados da estabilidade da formulação foram obtidos com lipossomas com carga negativa. A CIM de TZL e TZL-Lipo variou entre 64 a 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 128 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, indicando boa atividade frente as amostras de *Candida*. O modelo experimental de candidíase mostrou que a taxa de sobrevivência no grupo tratado com TZL-Lipo foi maior que com fluconazol ($P<0,05$), mostrando um perfil de baixa toxicidade para a nova formulação. Investigações como esta são realizadas usando testes *in vitro* ou modelo de infecção animal, e os resultados são utilizados para otimizar a administração e definir resistência clínica ou orientar quanto a sensibilidade de um novo composto.

Palavras-chave: Derivado triazólico, Lipossoma, Candidíase, Atividade antifúngica *in vitro*, Modelo experimental *in vivo*.

1 Introdução

O número de infecções fúngicas têm aumentado significativamente e tornado-se evidentes nas últimas décadas (Lopez-Martinez, 2010). Há uma clara necessidade para o desenvolvimento de agentes terapêuticos antimicóticos eficazes para o tratamento dessas infecções, uma vez que as principais classes de antifúngicos disponíveis têm encontrado resistência no uso clínico (Chen e Sobel, 2005; Rybak e Akins, 2001). Entre essas classes, os triazóis são os de uso mais extenso nas aplicações clínicas devido a seu espectro amplo e sua alta potência (Sheehan et al., 1999).

Os compostos triazólicos possuem uma variedade de atividades biológicas associadas e também são fungicidas de amplo espectro, usados no tratamento de infecções superficiais e invasivas por fungo (Hoffman et al., 2000, Ulusoy et al., 2001, Demirbas et al., 2005). Essas moléculas são inibidores competitivos do lanosterol 14 α -demetilase (citocromo P-450), levando à diminuição da biossíntese fúngica do ergosterol, que é um composto-chave da membrana da célula fúngica, prevenindo, portanto, o crescimento fúngico (Wei et al., 2006).

Diversas tentativas para minimizar os efeitos colaterais das drogas fungicidas foram feitas por meio de novas formas farmacêuticas, como a anfotericina B, encapsulada em lipossomas (Galvada et al., 2005; Olson et al., 2005). Devido à baixa solubilidade, além da significantes nefro e hepatotoxicidade, o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para a administração de triazóis é, dessa forma, desejável. Como exemplo, o voriconazol, um triazólico de segunda geração derivado do fluconazol, apresentou maior risco de trauma no fígado em cerca de 20% dos pacientes tratados, seguido pelo itraconazol, outro triazólico, com 17% (Wang et al., 2010).

O uso de lipossomas como veículo de transporte de fármacos no corpo humano tem ganhado destaque nos últimos anos. Eles têm sido utilizados no transporte de moléculas lipofílicas, para a estabilidade de compostos suscetíveis à hidrólise e redução da toxicidade (Santos-Magalhães et al., 2000). Também tem sido documentado, que as aplicações clínicas dos lipossomas se dão principalmente para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, assim como no câncer (Torchilin, 2005, 2006).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi, primeiramente, desenvolver uma fórmula lipossomal contendo 2-[1-(4-clorofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol, um substância da classe dos 1,2,3-triazóis (Fig. 1).

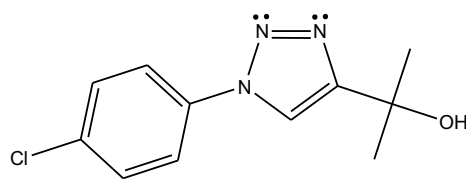


Figura 1. Estrutura do 2-[1-(4-clorofenil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propano-2-ol evidenciando o par de elétrons não-ligantes nos átomos N-2 e N-3 do núcleo triazólico.

Esta molécula foi escolhida por seu potencial antifúngico de acordo com análises anteriores. As formulações lipossomais tiveram sua atividade antifúngica avaliada *in vitro* e em um modelo murino de candidíase. Descrevemos a preparação e a caracterização das formulações lipossomais, bem como a cinética de liberação *in vitro* da molécula encapsulada.

2 Materiais e métodos

2.1 Linhagens e métodos de crescimento

Vinte linhagens de *Candida albicans*, cinco de *C. krusei*, onze de *C. parapsilosis* e cinco de *C. tropicalis* foram fornecidas pela Coleção de Culturas – Micoteca URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. As linhagens foram preservadas em óleo mineral a 18 °C (Sherf, 1943). Foram efetuados testes de viabilidade em todas as linhagens e a subsequente confirmação taxonômica de suas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (Hoog e Guarro, 2000). Na Tabela 1, foram resumidos espécies, números de registro, ano de estoque e isolamento. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizado como referência de linhagem.

2.2 Atividade antifúngica

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado durante os experimentos foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha). O fármaco comercial utilizado para comparação foi o fluconazol (FZL, Pfizer, Nova York,

EUA), preparado em água destilada, em concentrações variando de 0,125 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O novo derivado triazólico puro foi diluído em DMSO em soluções padrão de concentração de 1.024 mg.mL^{-1} . As concentrações testadas de TZL variaram de 2 a 1.024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As *Candida* spp. foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubadas a 35 °C. Foram preparadas as suspensões dos isolados, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2\text{-}5 \times 10^3$ céls.mL⁻¹.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas testadas, e as placas foram incubadas a 35 °C durante dois dias antes de ler os resultados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do FZL e TZL. As CIMs para TZL e FZL foram determinadas para 100% e $\geq 80\%$ de inibição em relação aos poços controles. Para determinar a Concentração Mínima Fungicida (CMF) do TZL, o conteúdo dos poços que mostraram 100% de inibição no crescimento foram cultivados para o meio SDA em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35 °C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CMF foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico.

A sensibilidade do TZL foi determinada de acordo com o método de referência M27-A3 (CLSI, 2008), baseado na variação de sensibilidade do FZL ($\leq 0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Cada experimento foi realizado em duplicata. O CIM e o CMF para cada antifúngico foram determinados. O triazol encapsulado em lipossomas (TZL-Lipo) foram testados sob as mesmas concentrações, e o CIM foi determinado sob as mesmas condições do TZL. Entretanto, não foi diluído em DMSO, mas adicionado diretamente às placas de microtitulação de 96 poços com RPMI após formulação.

2.3 Preparação dos derivado triazólico encapsulado em lipossomas

Os triazóis encapsulados em lipossomas (TZL-Lipo) foram preparados utilizando-se o método de hidratação de filme lipídico (Andrade et al., 2004). Sumariamente, os lipídios (fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina na proporção molar de 7:2:1) e o triazol (TZL; 1.0-4.0 mg/mL) foram dissolvidos em uma mistura de $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (3:1 v/v) sobre um agitador magnético. A concentração final dos lipídios foram 42 mM.

Os solventes foram removidos a vácuo durante 60 minutos (37 ± 1 °C, 80 rpm), resultando em uma formação do filme. Esses lipídios foram, então, hidratados com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4, produzindo lipossomas multilamelares (MLV). A suspensão de lipossomas foi mantida sob um agitador magnético durante 5 minutos, sendo, em seguida, sonicada (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 300 segundos, para produzir lipossomas unilamelares pequenas (SUV). Os lipossomas foram também liofilizados a 4×10^{-6} Barr em -80 °C utilizando trealose como crioprotetor no processo de liofilização (1 g de trealose representa 10% do volume total da formulação p/v).

2.4 Caracterização e avaliação físico-química das formulações

A estabilidade do TZL-Lipo foi avaliada através de testes de estabilidade acelerada e a longo prazo. Amostras dos lipossomas foram submetidos a centrifugação (1,300 g por 1 hora a 25 °C), agitador magnético horizontal (180 vibrações/min por 48 horas a 37 °C) e ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento (-18 °C por 16 horas e 25 °C por 8 horas).

A análise físico-química foi realizada imediatamente após a preparação. Foram analisados parâmetros como aparência macroscópica, exame morfológico, diâmetro da partícula, variações de pH, conteúdo do TZL nos lipossomas, taxa de encapsulação e potencial zeta. Uma alíquota de amostra de lipossoma (25 µL) foi diluída em 10 mL de metanol e, em seguida, sonicada durante 5 minutos para determinar o conteúdo do TZL por meio de espectrofotometria a 253 nm, utilizando uma curva padrão de TZL com concentrações variando de 0.5 a 3 µg/mL. A eficiência do encapsulamento foi determinada pela técnica ultrafiltração/ultracentrifugação Ultrafree® (Millipore, EUA). Após a centrifugação das amostras de TZL-Lipo (Ultracentrifuge KT 20000, Kubota, Japão) a 8.776 g por 1 hora a 4 °C, a concentração de TZL no sobrenadante foi também medida por meio de espectrofotometria UV a 253 nm e a taxa de encapsulação do TLZ foi calculado em relação ao seu conteúdo inicial na formulação lipossomal. O potencial zeta (ξ) dos lipossomas foi aferido (Zetatrac NC-148, Microtrac) para determinar a carga elétrica superficial das vesículas através da diluição de 50 µL de lipossomas em 5 mL de água purificada.

2.5 Cinética da liberação *in vitro* do triazol encapsulado nos lipossomas

A cinética de liberação *in vitro* dos triazóis encapsulado nas vesículas lipossomais foi analisada utilizando a técnica de diálise em solução tampão fosfato de

pH 7,4 a 37 °C nas condições Sink. Resumidamente, uma alíquota da formulação lipossomal (2 mL) contendo TZL foi inserida em uma membrana de diálise (MW cut-off 12.400), a qual foi subsequentemente, selada e suspensa no meio de liberação (80 mL). O sistema foi mantido sob um agitador magnético a 37 °C. Em intervalos apropriados, amostras de 1 mL do meio de liberação foram colhidas e examinadas para detecção de TZL por meio de espectrofotometria a 253 nm. A curva padrão de TZL a concentrações de 0,5 a 3 µg/mL foi utilizada para determinar a concentração triazólica. Após cada coleta, o meio de liberação era substituído por nova solução tampão fosfato (1 mL). A cinética de liberação *in vitro* de TZL livre foi também realizada como descrito acima.

2.6 Animais e tratamento imunossupressivo

Ratos fêmeas, de oito a doze semanas de idade, pesando 250 g, foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Farmacologia e Fisiologia (UFPE) e utilizados no estudo. Os animais foram criados sob condições específicas de assepsia e manuseados de acordo com procedimentos experimentais estabelecidos e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.003830/2008-76). Ademais, os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados foram conduzidos em conformidade com políticas e leis internacionais.

Um modelo murino neutropênico foi usado em todos os estudos para se atingir candidíase disseminada (Andes et al., 2008). Foi induzida neutropenia nos animais (contagem de células polimorfonucleares, $<100/\text{mm}^3$) pela injeção de ciclofosfamida (Mead Johnson Pharmaceuticals, Evansville, IN) subcutaneamente 4 dias antes da infecção fúngica (150 mg/Kg de peso corporeo), 1 dia antes da infecção (100 mg/Kg) e 2 dias após a infecção (100 mg/Kg).

A contagem total de leucócitos no sangue dos animais imunossuprimidos (IS) em comparação aos imunocompetentes (IC) foi utilizada para confirmar a imunossupressão.

2.7 Modelo de infecção

Candida albicans URM 3719 foi cultivada em SDA adicionado de extrato de levedura 48 h antes da infecção. O inóculo foi preparado obtendo-se cinco colônias em 5 mL de solução salina esterilizada a 0,9%. O inóculo final foi ajustado em 10^8 células/mL através de câmara de Neubauer centrifugadas em baixa velocidade (1000 g) e lavadas com solução salina. Candidíase disseminada foi atingida pela injeção de 0,2 mL do inóculo via intraperitoneal 24 h antes do início da terapia com os fármacos (FZL

ou TZL-Lipo). A viabilidade celular das leveduras para inoculação nos animais foi >95%, medida pela exclusão por azul de tripano. As células de leveduras no sangue dos animais infectados (seis por grupo) foram reobtidos através de retrocultivo em placas de Petri com SDA.

2.8 Agentes antifúngicos e terapia

O FZL foi diluído em PBS e administrado intragastricamente, por 5 dias consecutivos após desafio, a 200 mg/Kg/dia a um grupo formado por seis animais. O TZL-Lipo foi administrado intraperitonealmente, por 5 dias consecutivos após desafio, a 24 mg/Kg/dia também a um grupo de seis animais. Ambos os tratamentos foram realizados em seis animais por grupo após imunossupressão e infecção pelo isolado. Adicionalmente, outro grupo (seis animais) foi apenas imunossuprimido e mais um grupo foi imunossuprimido com subsequente infecção, ambos usados como controle.

A eficácia de ambos fármacos foi avaliada através do prolongamento da taxa de sobrevivência dos animais e pela ausência de células de leveduras nas amostras de sangue analisadas. Para os estudos de sobrevivência e as amostras de sangue, grupos de seis animais foram aleatoriamente escolhidos para cada tratamento e controle. Para estudo de sobrevivência, os animais foram observados diariamente por 28 dias. Amostras de sangue foram analisadas em um, três, sete e quinze dias após desafio em todos os animais sobreviventes.

2.9 Análises estatísticas

O tempo de sobrevivência entre grupos foi estimado pela análise de variância simples utilizando a Comparação Múltipla de Tukey, com significância definida em $P < 0,05$. Foram realizadas análises em triplicata para cada experimento. Análises estatísticas foram calculadas utilizando o GraphPad Prism 4 (software GraphPad, CA, EUA).

3 Resultados

3.1 Caracterização dos triazóis encapsulados em lipossomas

Diferentes formulações de TZL-Lipo foram preparadas a fim de otimizar a estabilidade. Características dos lipossomas com carga de superfície positiva e negativa estão resumidas na Tabela 2. Formulações lipossomais exibiram um reflexo azulado característico de vesículas unilamelares pequenas em qualquer que seja a concentração triazólica (1,0–4,0 mg/mL). Essas preparações permaneceram estáveis por 180 dias

quando estocadas em forma de suspensão a 4 °C, exibindo, após esse período, precipitação da molécula e floculação com lipídios.

A formulação de carga negativa de TLZ-Lipo composta de 42 µmol de lipídios/10 µL de tampão e 4,0 mg/mL do TZL foi escolhida para realizar os estudos *in vitro* e *in vivo*. O conteúdo do TZL em lipossomas foi de 95,27% e a taxa de encapsulação foi de 82,42%. Além disso, após testes de estabilidade acelerada e de longa-duração, a formulação negativa preservou sem mudanças significativas às suas características iniciais, após a resuspensão da formulação lipossomal liofilizada.

3.2 Cinética da liberação *in vitro* do derivado triazólico a partir dos lipossomas

O perfil cinético de liberação *in vitro* do TZL nas formulações lipossomais se encontra na Figura 1. Quase 70% do TZL foi liberado em 3 h, correspondendo ao efeito explosivo inicial, seguido pela liberação linear com 80% a 10 h, encontrando 92% em 20 h. A cinética de liberação do triazol dos lipossoma foi ajustada de acordo com o modelo exponencial $M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$, rendendo $M_\infty = 92,15 \pm 0,137 \mu\text{g}$, $k_1 = 0,559 \pm 0,050$ e $k_2 = 0,287 \pm 0,076 \text{ h}^{-1}$ com um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9702$.

3.3 Atividade antifúngica *in vitro*

Os resultados da atividade antifúngica através da CIM medidos visualmente estão descritos na Tabela 1. Todas os isolados analisados tiveram CIM determinado para TZL, TZL-Lipo e FZL. O TLZ mostrou atividade fungistática em concentrações variando de 64 a 256 µg.mL⁻¹ e atividade fungicida em concentrações de 64 a 512 µg.mL⁻¹. O TZL-Lipo mostrou atividade fungistática em concentrações variando de 128 a 512 µg.mL⁻¹ e atividade fungicida em concentrações de 128 a 1.024 µg.mL⁻¹. O TZL apresentou a mesma concentração fungistática e fungicida para os isolados 4125, 4126 e 4127 (128 µg.mL⁻¹ para 4125 e 4126; 256 µg.mL⁻¹ para 4127) e TZL-Lipo (256 µg.mL⁻¹ para 4125 e 4126; 512 µg.mL⁻¹ para 4127).

O FZL apresentou apenas atividade fungistática em concentrações variando de 0.5 a 64 µg.mL⁻¹, onde oito isolados foram dose-depentes apresentando CIMs entre 16-32 µg.mL⁻¹ e nove foram resistentes com CIMs $\geq 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para cada experimento, os inóculos apresentaram claramente um crescimento detectável após o período de incubação escolhido, indicando que todos os isolados foram viáveis e que as condições utilizadas foram adequadas para o crescimento fúngico.

3.4 Atividade antifúngica *in vivo*

Foi previamente observado em nossos experimentos que animais infectados sistemicamente com linhagem URM 3719, apresentam um padrão de mortalidade dramaticamente diferente, quando comparados com outros isolados dessa espécie. Taxas de mortalidade resultantes de infecção sistêmica com 10^8 células/mL de URM 3719 ocorreram até doze dias, período após o qual não houve morte. Após infecção do animal com a mesma dose de outros isolados, a sobrevivência foi mais elevada. A Figura 2 mostra os resultados de estudos de sobrevivência obtidos com a levedura patogênica testada. O tratamento com FZL (grupo III) não modificou a sobrevivência de ratos infectados em relação ao grupo controle II (animais imunossuprimidos e infectados), entretanto a formulação lipossomal contendo o novo derivado triazólico (grupo IV) diminuiu a taxa de mortalidade do grupo não apresentando diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo I (apenas animais imunossuprimidos) que apresentou baixa taxa de mortalidade.

As amostras de sangue cultivados em SDA evidenciaram infecção com sucesso em todos os ratos até três dias após o desafio. Nenhum colônia de levedura foi reobtida novamente após 15 dias nos animais sobreviventes.

4 Discussão

As espécies *Candida* estão entre as causas mais comuns de micose humana (Lima-Neto et al., 2011). Por essa razão, tem sido devotado um considerável esforço em pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas, mais eficientes e com menos efeitos colaterais. O uso potencial da encapsulação em lipossomas na busca de uma otimização na eficácia farmacocinética e terapêutica dessas moléculas tem sido relatado na literatura (Lira et al., 2009).

Neste trabalho, obtivemos uma formulação com densidade eletrônica negativa similar ao AmBisome®, única formulação lipossomal disponível no mercado contra patógenos fúngicos. Essa carga produz uma incompatibilidade com a célula dos mamíferos, minimizando sua toxicidade, além de fornecer atração eletrostática com a célula fúngica, e, conseqüentemente, altas concentrações no alvo infeccioso (Anaissie et al., 1991; Ostrosky-Zeichner et al., 2003).

Dados relatados na Tabela 1 mostram que o novo derivado triazólico (TZL), bem como sua formulação lipossomal (TZL-Lipo) apresentou atividade similar contra os isolados clínicos testados com moderada ação contra isolados de *Candida*. Foi

observado que esses compostos bioativos mostraram efeito fungicida, e não apenas fungistático, contra todos os isolados avaliados. Além disso, constatamos através de nosso modelo de infecção que apenas a imunossupressão não conduz a taxas significativas de mortalidade. Entretanto, infecção após imunossupressão é quase letal. O tratamento com triazol encapsulado prolongou a sobrevivência dos animais infectados (grupo IV), demonstrando não haver diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo I. Em contrapartida foi observado que o tratamento dos animais com FZL (grupo III) não prolongou significativamente a sobrevivência desse grupo, não demonstrando diferenças estatísticas com o grupo II.

A eficácia comparativa da formulação lipossomal do triazol e fluconazol pode ser controverso devido às suas vias de administração. Essa variabilidade torna difícil demonstrar diferenças significantes na eficácia da prática clínica. Entretanto, ao utilizar um modelo murino de candidíase, Anaissie et al. (1994) mostraram uma correlação positiva, entre a atividade antifúngica frente isolados de *Candida* da anfotericina B e do fluconazol, e sua habilidade de prolongar a sobrevivência e reduzir a contagem de células infecciosas no tecido dos animais infectados, mesmo quando administrado por diferentes vias. De acordo com Cenci et al. (1997), mais relevante que a rota deve ser a capacidade de interação tanto do fármaco com *C. albicans* como dos mecanismos de defesa do hospedeiro, levando a um controle efetivo do desenvolvimento fúngico.

A nova formulação lipossomal do derivado triazólico se mostrou como uma alternativa interessante para antifúngicos sistêmicos disponíveis comercialmente. Testes e estudos futuros com outras espécies de fungo e diferentes tipos de infecção são imprescindíveis.

Tabela 1. Atividade antifúngica de um novo derivado triazólico encapsulado em lipossomas e fluconazol frente isolados clínicos de *Candida*.

Espécies	Accession n° (URM)	Estocagem (em anos)	Substrato de isolamento	CIMs (µg/mL)		
				TZL	TZL-Lipo	FZL
<i>C. albicans</i>	4990	01	Secreção vaginal	256	512	>64
<i>C. albicans</i>	4987	01	Secreção vaginal	128	256	16
<i>C. albicans</i>	4986	01	Secreção vaginal	128	256	16
<i>C. albicans</i>	4820	02	Escamas ungueais	256	512	4
<i>C. albicans</i>	4819	02	Escamas ungueais	128	256	4
<i>C. albicans</i>	4817	02	Escamas ungueais	128	256	4
<i>C. albicans</i>	4609	03	Sangue	128	256	4
<i>C. albicans</i>	4606	03	Sangue	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4388	05	Secreção orofaríngea	128	256	>64
<i>C. albicans</i>	4387	05	Secreção orofaríngea	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4386	05	Secreção orofaríngea	128	256	1
<i>C. albicans</i>	4385	05	Secreção orofaríngea	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4384	05	Secreção orofaríngea	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4260	05	Secreção orofaríngea	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4127	07	Escamas inguinal	128	256	0,5
<i>C. albicans</i>	4126	07	Urina	128	256	0,5
<i>C. albicans</i>	4125	07	Escarro	256	512	0,5
<i>C. albicans</i>	4124	07	Secreção orofaríngea	256	512	>64
<i>C. albicans</i>	3719	10	Dentina	256	512	64
<i>C. albicans</i>	3716	10	Dentina	256	512	0,5
<i>C. krusei</i>	4802	02	*	256	512	64
<i>C. krusei</i>	4263	05	Secreção orofaríngea	256	512	64
<i>C. krusei</i>	1059	48	*	64	128	16
<i>C. krusei</i>	934	49	Biópsia de apêndice	256	512	64
<i>C. krusei</i>	109	52	*	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4984	01	Secreção vaginal	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4970	01	Secreção vaginal	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4889	02	Sangue	64	128	2
<i>C. parapsilosis</i>	4818	02	Escamas ungueais	128	256	4
<i>C. parapsilosis</i>	4804	02	IFM	128	256	8
<i>C. parapsilosis</i>	4608	03	Sangue	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4607	03	Sangue	128	256	4
<i>C. parapsilosis</i>	4261	05	Secreção orofaríngea	256	512	>64
<i>C. parapsilosis</i>	3627	12	Escarro	64	128	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	3624	12	Escarro	64	128	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	3621	12	Escarro	64	128	0,5
<i>C. parapsilosis</i> ^e	ATCC 22019	-	-	256	512	8
<i>C. tropicalis</i>	4790	02	Farinha de mandioca	128	256	32
<i>C. tropicalis</i>	4262	06	Secreção orofaríngea	128	256	4
<i>C. tropicalis</i>	1150	46	Lingua	128	256	>64
<i>C. tropicalis</i>	933	49	Secreção vaginal	128	256	4
<i>C. tropicalis</i>	916	49	Fezes	128	256	4

^a O valor de CFM foi definido como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir totalmente o desenvolvimento da levedura. Os valores foram determinados em leitura após dois dias de incubação a 37 °C. O inóculo contém aproximadamente $2,5 \times 10^3$ céls/mL. Meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). A concentração final dos tiofenos foi entre 2-1.024 µg/mL e 0,125-64 µg/mL para fluconazol.

TZL = Triazol

TZL-Lipo = Triazol encapsulado em lipossomas

FZL = Fluconazol

Candida parapsilosis ATCC 22019 foi usado como linhagem referência

* Substrato não identificado

Tabela 2. Estudo de pré-formulação e características físico-químicas de derivado triazólico em liposomas formuladas com cinco diferentes razões molares do fármaco:lipídio.

*Formulação apresentou precipitação de molécula

TZL:lipídio Razão molar	mM	TZL (mg/mL)	Apresentação macro e microscópica	Ø (nm)	ξ (mV)	pH
1:9.98	42	1	Estável	88,3	$3,37 \pm 0,66$	$7,32 \pm 0,1$
1:4.99	42	2	Estável	90,9	$2,93 \pm 0,23$	$7,54 \pm 0,1$
1:3.33	42	3	Estável	96,5	$2,92 \pm 0,23$	$7,56 \pm 0,1$
1:2.50	42	4	Estável	109,8	$-24,30 \pm 1,79$	$7,64 \pm 0,1$
1:2.00	42	5	Instável*	-	-	-

- Parâmetros não avaliados

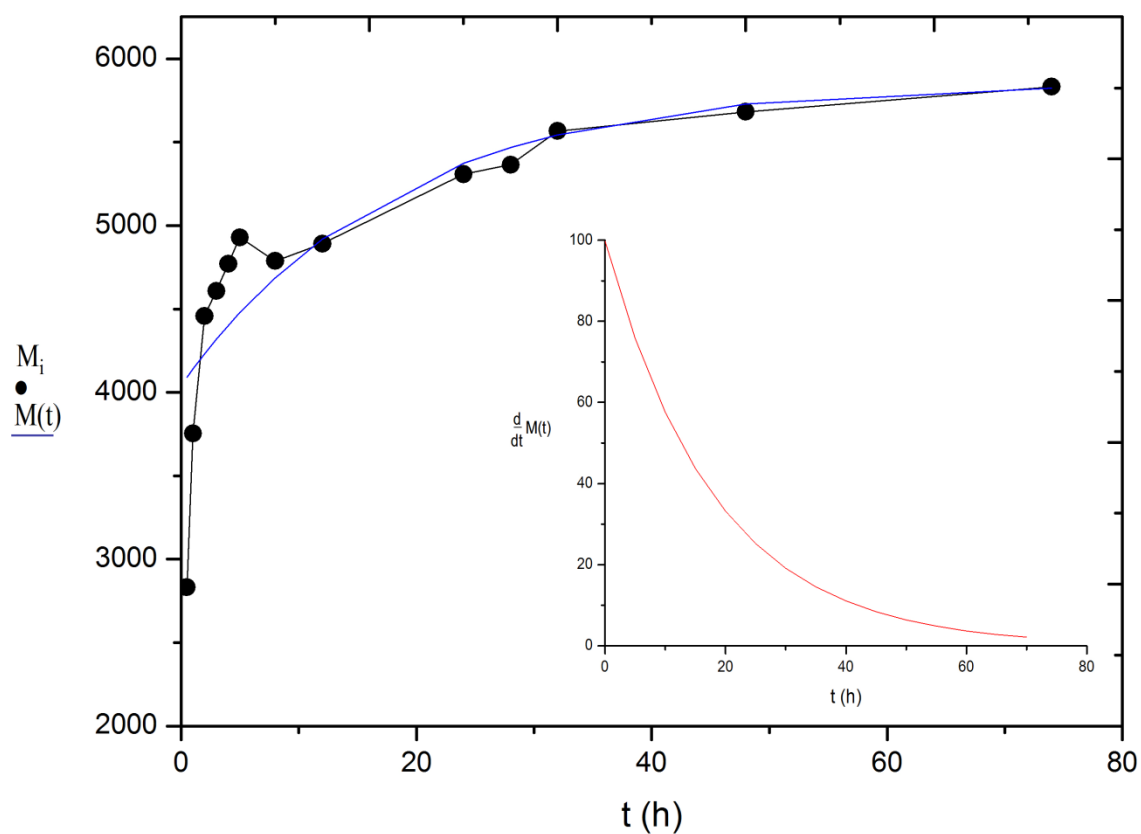


Figura 2. Perfil de liberação *in vitro* do triazol encapsulado em lipossomas carregados negativamente (4 mg/mL) em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C. Resultados são uma media de três experimentos.

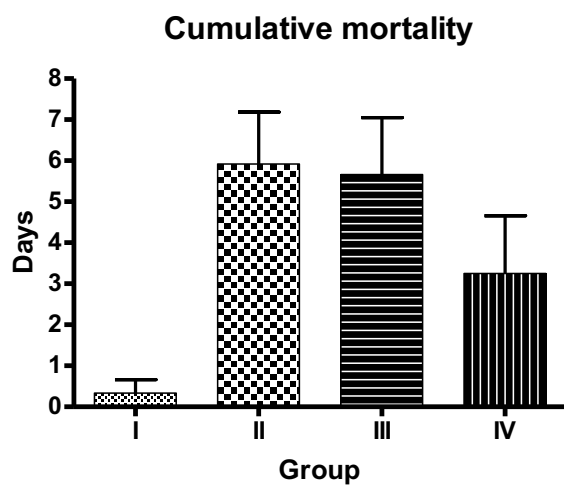


Figura 3. Média da mortalidade acumulada em dias após imunossupressão dos cobaias infectados com *C. albicans* URM 3719. I, grupo apenas imunossuprimido; II, grupo imunossuprimido com posterior infecção; III, grupo imunossuprimido, infectado e tratado com fluconazol; IV, grupo imunossuprimido, infectado e tratado com TZL-Lipo. $P < 0.01$ em I *versus* II e $P < 0.05$ em I *versus* III, mas $P > 0.05$ em I *versus* IV.

Referências Bibliográficas

- Anaissie, E., Paetznick, V., Proffitt, R., Adler-Moore, J., Bodey, G.P., 1991. Comparison of the *in vitro* antifungal activity of free and liposome encapsulated amphotericin B. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 655-668.
- Anaissie, E.J., Karyotakis, N.C., Hachem, R., Dignami, M.C., Rex, J.H., Paetznick, V., 1994. Correlation between *in vitro* and *in vivo* activity of antifungal agents against *Candida* species. J. Infect. Dis. 170, 384-389.
- Andes, D., Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Prince, R.A., Marchillo, K., Ashbeck, J., Hou, J., 2008. *In Vivo* Pharmacodynamic characterization of anidulafungin in neutropenic murine candidiasis model. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 539-550.
- Andrade, C.A., Correia, M.T., Coelho, L.C., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. Int. J. Pharm. 278, 435-445.
- Bodey, G.P., 1992. Azole antifungal agents. Clin. Infect. Dis. 14, S161-169.
- Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bistoni, F., Romani, L., 1997. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. J. Infect. Dis. 176, 217-226.
- Chen, A., Sobel, J.D., 2005. Emerging azole antifungal. Expert. Opin. Emerg. Drugs. 10, 21-33.
- CLSI, 2008. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.
- Demirbas, N., Demirbas, A., Karaoglu, S.A., 2005. Synthesis and biological activities of new 1,2,4-triazol-3-one derivatives. Bioorg. Khim. 31, 430-440.
- Gavaldà, J., Martín, T., López, P., Gomis, X., Ramírez, J.L., Rodríguez, D., 2005. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. Clin. Microbiol. Infect. 11, 999-1004.
- Hoffman, H.L., Ernst, E.J., Klepser, M.E., 2000. Novel triazole antifungal agents. Expert. Opin. Invest. Drugs. 9, 593-605.
- Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, Utrecht.
- Kolb, H.C., Sharpless, K.B., 2003. The growing impact of click chemistry on drug discovery. Drug. Disc. Today. 8, 1128-1137.

- Lima-Neto, R.G., Beltrão, E.I.C., Oliveira, P.C., Neves, R.P., 2011. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses*. 54, 23-29.
- Lira, M.C.B., Siqueira-Moura, M.P., Rolim-Santos, H.M.L., Galetti, F.C.S., Simioni, A.R., Santos, N.P., Egito, E.S.T., Silva, C.L., Tedesco, A.C., Santos-Magalhaes, N.S., 2009. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J. Lip. Res.* 19, 49-58.
- Lopez-Martinez, R., 2010. Candidosis, a new challenge. *Clin. Dermatol.* 28, 178-184.
- Olson, J.A., Adler-Moore, J.P., Smith, P.J., Proffitt, R.T., 2005. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4895-4902.
- Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K.A., Rex, J.H., Cohen, S.H., 2003. Amphotericin B: time for new gold standart. *Clin. Infect. Dis.* 37, 415-425.
- Rybak, M.J., Akins, R.L., 2001. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptide resistance: clinical significance and treatment options. *Drugs*. 61, 1-7.
- Santos-Magalhães, N.S., Pontes, A., Pereira, V.M.W., Caetano, M.N.P., 2000. Colloidal carriers for benzathine penicilin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 208, 71-80.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M., 1999. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 40-79.
- Sherf, A.F., 1943. The method for maintaining *Phytophthora sepedomica* for long periods without transf. *Phytopathology*. 31, 30-32.
- Stewart, J.J.P., 2007. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements *J. Mol. Modeling*. 13, 1173-1213.
- Stewart, J.J.P., 2008. [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net). Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs.
- Torchilin, V.P., 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug. Discov.* 4, 145-160.
- Torchilin, V.P., 2006. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 58, 1532-1555.
- Ulusoy, N., Gursoy, A., Otuk, G., 2001. Synthesis and antimicrobial activity of some 1,2,4-triazole-3-mercaptoacetic acid derivatives. *Farmaco*. 56, 947-952.
- Wang, J.L., Chang, C.H., Young-Xu, Y., Chan, K.A., 2010. Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and

definitive therapy for invasive fungal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2409-2419.

Wei, Q.L., Zhang, S.S., Gao, J., Li, W.H., Xu, L.Z., Yu, Z.G., 2006. Synthesis and QSAR studies of novel triazole compounds containing thioamide as potential antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7146-7153.

**6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA CLÁSSICA *VERSUS* NOVA
IDENTIFICAÇÃO ESPECTRAL (MALDI-TOF ICMS) DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA***

Artigo a ser submetido para:

Journal of Clinical Microbiology

**Identificação fenotípica clássica *versus* nova identificação espectral
(MALDI-TOF ICMS) de isolados clínicos de *Candida***

Reginaldo Lima-Neto¹, Cledir Santos², Nelson Lima², Paula Sampaio³, Célia Pais³ e
Rejane P. Neves¹

¹Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco
(UFPE), Cidade universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil

²IBB-Instituto de Biotechnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do
Minho, Braga, Portugal

³Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Universidade do Minho, Campus of Gualtar, 4710-
057 Braga, Portugal

Resumo

O aumento significativo na frequência de candidíase no mundo tem conduzido o estudo e desenvolvimento de técnicas rápidas e reprodutíveis que promovam a substituição dos métodos tradicionais usados para identificação e tipagem de isolados clínicos de *Candida*. Assim, a *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Intact Cell Mass Spectrometry* (MALDI-TOF ICMS) é uma técnica físico-química muito rápida e confiável capaz de identificar microrganismos em nível de espécie e, em alguns casos diferenças intra específica. O objetivo do presente trabalho foi comparar a taxonomia fenotípica clássica, através de análises morfológicas e bioquímicas, e o novo método espectral pelo MALDI-TOF ICMS de espécies de *Candida* provenientes de casos clínicos. Os resultados mostraram 26,8% de discrepância entre a fenotipagem clássica e o MALDI-TOF ICMS sendo então, os isolados incoerentes analisados por biologia molecular através de sequenciamento de regiões ITS para cada isolado. Os dados do MALDI-TOF ICMS foram compatíveis com os da biologia molecular. Além disso, detectamos que o principal obstáculo da nova técnica fenotípica através dos espectros durante o processo de identificação é o armazenamento da diversidade microbiana através do banco de dados.

Palavras-chave: *Candida*, MALDI-TOF ICMS, Análise espectral, Análise molecular, Taxonomia clássica

1 Introdução

O número e o impacto clínico das infecções graves por espécies de leveduras aumentou consideravelmente nos últimos anos, particularmente em imunossuprimidos. Leveduras pertencentes ao gênero *Candida* têm surgido como importantes patógenos oportunistas nestes pacientes e, atualmente, constitui uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva (Marklein et al. 2009). *Candida* é um gênero complexo formado por 163 espécies anamórficas. Até poucos anos apenas um pequeno número de espécies patogênicas de *Candida* eram conhecidos, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*. Entretanto, nos últimos anos o número de espécies relacionadas com infecções em seres humanos aumentou consideravelmente (Putignani et al. 2010). Cerca de 20 espécies de *Candida* têm causado doença nos seres humanos, mas a lista de espécies de importância médica tem se tornado crescente (Correia et al. 2006). Com um total estimado de 72,8 milhões de infecções oportunistas por *Candida* por ano no mundo, a razão caso/mortalidade decorrente dessas leveduras está na faixa de 33,9% (Marklein et al. 2009).

A técnica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Intact Cell Mass Spectrometry* (MALDI-TOF ICMS) tem sido aplicada para detectar e diferenciar leveduras e ainda é capaz de distinguir espécies fortemente relacionadas, como *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. bracarensis* (Santos et al. 2011), previamente identificados por biologia molecular e critérios convencionais quimiotaxonômicos (Sullivan et al. 1995; Tavanti et al. 2005, Correia et al. 2006).

É reconhecida a dificuldade de identificar linhagens de leveduras em nível de espécie por métodos taxonômicos convencionais, uma vez que são altamente dependentes de variáveis como meio de cultura e temperatura (Cendejas-Bueno et al. 2010). Há um número considerável de métodos de identificação, que vão desde técnicas rápidas como meios seletivos como Chromagar *Candida*, a um grande número de procedimentos com abordagens de biologia molecular. Esses métodos podem requerer tempo prolongado e/ou necessitam de uma análise acurada. No entanto, os conhecimentos sobre fenotipagem clássica e modernas abordagens de biologia molecular torna-se fundamental quando o isolado apresenta características incomuns (Qian et al. 2008). Por outro lado, o tempo necessário para a identificação do patógeno é um determinante importante das taxas de mortalidade, relacionada sobretudo, à infecção em pacientes hospitalizados.

As taxas de mortalidade e os custos associados com doenças infecciosas podem ser significativamente reduzidos através do emprego de novas técnicas de identificação rápida (Essendoubi et al. 2005). Essas restrições têm levado a um crescente interesse na técnica de MALDI-TOF MS, por ser rápida e confiável para a identificação microbiana.

O objetivo do presente trabalho foi comparar a capacidade discriminatória entre a abordagem fenotípica clássica, incluindo análises morfológicas e bioquímicas, e o novo método espectral de identificação através do MALDI-TOF ICMS de isolados clínicos de *Candida*.

Os isolados que possuíram incompatibilidade taxonômica nas duas técnicas foram analisados por biologia molecular. A fim de fornecer informações para o acompanhamento clínico do paciente o perfil de sensibilidade frente a dois agentes antifúngicos para estes isolados também foram avaliados.

2. Materiais e Métodos

2.1 Condições de crescimento: Todas as 41 culturas de leveduras analisadas foram obtidas da Coleção de Culturas URM. (<http://www.ufpe.br/micoteca/historico.php>). Linhagem de *Escherichia coli* DH5a foi obtida da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, www.micoteca.deb.uminho.pt). *Trichophyton rubrum* foi obtido da MUM e incorporada nas análises com um controle externo. Todas as culturas foram adquiridas a partir de criopreservação sob congelamento a -80 °C. Crioculturas foram descongelados, abertas e as linhagens cultivadas de acordo com as instruções emitidas por URM-UFPE e MUM. Inóculos purificados de células das leveduras foram cultivados e mantidos em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Células de *E. coli* foram cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB). Incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 37 °C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto a pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI TOF ICMS.

2.2 Identificação fenotípica clássica: Essas análises foram realizadas no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Todos os 41 isolados foram identificados através de análises

macro e micromorfológicas. A cor, aspecto e superfície de cada colônia, bem como a morfologia celular de cada isolado foi considerada nesse estudo. Identificação bioquímica através auxonograma e zimograma, além da indução de estruturas reprodutivas, clamidosporos e produção de urease foi realizado. Sete dos 41 isolados apresentaram identificação dúbia através de taxonomia fenotípica clássica. Com propósito de clarificar fenotipicamente a identificação desses isolados foram analisados em VITEK 1 no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Real Português, Recife, Brasil.

2.3 Preparação da placa alvo de MALDI-TOF ICMS: Fragmento de células foi diretamente transferido do meio de cultura para os 48 anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5 µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75 mg/mL de 2,5-ácido dihidroxibenzóico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]) e levemente misturado. Para *E. coli* a adição da solução matrix foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico. Todas as amostras foram secadas em temperatura ambiente (18 ± 2 °C). Cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C.

2.4 Aquisição de dados pelo MALDI-TOF ICMS: As análises foram realizadas no Laboratório de Micologia e Biologia Molecular do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho no sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, Manchester, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm), onde a intensidade do laser foi ajustado ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5α com conhecido valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração externa. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foram exportadas ao software SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Postdam-Golm, Germany, www.anagnostec.eu) onde as identificações finais foram alcançadas. Identificação através do software SARAMIS™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

2.5 Análise de agrupamento pelo MALDI-TOF ICMS: Análise de grupo pelo espectro de massa do MALDI-TOF ICMS foi alcançado utilizando a base de dados do SARAMIS™. Nessa base de dados a lista de picos das amostras analisadas individualmente foi ordenada e comparada ao superespectro e/ou espectro de referência. Para ambos, os espectros de referência e superespectro, o SARAMIS™ utilizou um sistema de pontos com base na lista de picos que possuem sinais de massa com peso de acordo com sua especificidade. A determinação do peso de cada sinal teve como base dados empíricos de várias amostras de referência e linhagens bem caracterizadas. Superespectros, espectros consensuais contendo um padrão de sinais de massa, foram específicos para cada microrganismo e permite a identificação de isolados em nível de espécie, bem como análises de grupo de espectros de várias amostras. Espectros de referência são espectros empíricos individuais de espécies que não possuem dúvidas em sua posição taxonômica. Para ambos os casos, a similaridade entre os espectros individuais é expressa em número absoluto ou relativo de correspondência dos sinais de massa, após submissão dos dados para um link algoritmo de agrupamento aglomerativo.

2.6 Seqüenciamento de regiões ITS: Essas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Universidade do Minho, Braga, Portugal. Oito isolados que apresentaram identificação distinta entre a taxonomia clássica e a abordagem espectral foram analisadas por seqüenciamento ITS. A análise da seqüência foi realizado em toda a região ribossomal (ITS1/5-8S rDNA/ITS2), segundo White *et al* (1990). O sequenciamento foi realizado com um ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando protocolos padrão. Os isolados foram identificados ao nível de similaridade da seqüência em 95,0% ou mais.

2.7 Atividade antifúngica *in vitro*: Essas análises foram realizadas no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Todos os 41 isolados foram avaliados quanto ao perfil de sensibilidade para agentes antifúngicos. O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado durante os experimentos foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS;

0,165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os agentes antifúngicos comerciais utilizados foram a anfotericina B (AmpB; Bristol-Myers Squibb, Princeton, USA) diluída em DMSO e o fluconazol (FLU; Pfizer, Nova York, EUA), preparado em água destilada. Concentrações diferentes de ambos antifúngicos foram preparados e usados nos intervalos de 0,03 to 16 µg.mL⁻¹ para AmpB e 0,125 to 64 µg.mL⁻¹ para FLU.

As amostras clínicas de *Candida* foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA-Difco) e incubadas a 35 °C. Suspensões dos isolados foram preparadas e a densidade foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância a 530 nm utilizando um espectrofotômetro (Spectronic Genesys, Application SoftcardTM, Milton Roy). O volume final do inóculo foi ajustado para 5,0 ml de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2-5x10³ céls.mL⁻¹.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas testadas, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas antes da leitura dos resultados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos avaliados. As CIMs para AmpB e FLU foram determinadas para ter 100% e ≥80% de inibição em relação aos poços controles.

A sensibilidade antifúngica foi determinada de acordo com o método de referência M27-A3 (CLSI, 2008), baseado na variação de sensibilidade. Cada experimento foi realizado em triplicata. O CIM para cada antifúngico/isolado foi determinado.

3. Resultados e Discussão

No presente trabalho foi possível comparar a capacidade discriminatória entre a abordagem fenotípica clássica, incluindo análises morfológicas e bioquímicas, e o novo método espectral MALDI-TOF ICMS de leveduras isoladas a partir de casos clínicos. Quarenta e um isolados, a maioria de amostras clínicas obtidas de sítios anatômicos profundos, foram inicialmente identificados usando fenotipagem clássica (Tabela 1). Todos os 41 isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Candida* e assim distribuídos: *C. albicans* (20), *C. krusei* (5), *C. parapsilosis* (11) e *C. tropicalis* (5). O VITEK 1 também foi usado a fim de esclarecer algumas dúvidas sobre a identificação

fenotípica clássica dos isolados URM 4990, URM 4388, URM 4124, URM 4818, URM 4261, URM 4790 e URM 1150.

A partir das análises comparativas da Tabela 1 foi possível observar que para a identificação clássica e o MALDI-TOF ICMS houve discrepância em 11 isolados, 26,8% da população estudada que não corresponderam a mesma identificação.

Através das análises desses dados é possível observar que existe divergências entre os resultados obtidos da abordagem fenotípica clássica e os dados espectrais. Os isolados URM 4802, URM 4263, URM 1059, URM 934 e URM 109 foram identificados como *C. krusei* através de análises clássicas e *Issatchenkia orientalis* pelo MALDI-TOF ICMS. Ainda foram detectadas divergências entre as abordagens nos isolados URM 4261, URM 3627, URM 3624 e URM 3621. Esses quatro isolados foram identificados como *C. parapsilosis* através da análise fenotípica clássica. Entretanto, dois desses isolados, URM 4261 e URM 3624, foram identificados como *C. tropicalis* e os outros dois, URM 3627 e URM 3621, como *C. albicans* pelo MALDI-TOF ICMS.

Finalmente, ocorreu uma última discrepância entre os resultados obtidos através dos dois métodos avaliados de identificação para os isolados URM 3719 e URM 4608. O isolado URM 3719 foi identificado como *C. albicans* pela abordagem clássica e como *C. tropicalis* pelo MALDI-TOF ICMS. Por outro lado URM 4608 foi identificado como *C. parapsilosis* pela abordagem clássica e não identificado pelo MALDI-TOF ICMS. Contudo, ainda não identificado, este isolado foi agrupado no dendrograma em um *cluster* distinto (Figura 1), e posteriormente confirmado através de biologia molecular.

Além disso, um dos sete isolados analisados pelo VITEK 1 (URM 4261) foi identificado como sendo *C. parapsilosis* por essa técnica e, mais tarde identificado como *C. tropicalis* por MALDI-TOF ICMS. Ela corresponde a 14,3% da população total incongruência analisados por VITEK 1 e MALDI-TOF ICMS.

Um grupo de oito isolados dos onze que apresentaram inconsistência nos resultados entre as duas abordagens foram analisados por técnica de biologia molecular. A escolha dos isolados para a análise por biologia molecular foi a partir dos resultados obtidos pelo MALDI-TOF ICMS. Para o grupo de isolados URM 4802, URM 4263, URM 1059, URM 934 e URM 109 os quais foram identificados como *C. krusei* por fenotipagem clássica e como *Issatchenkia orientalis* pelo MALDI-TOF ICMS, foram escolhidos para identificação através biologia molecular URM 4802 e URM 1059. Esses

dois isolados localizaram-se nas extremidades agrupamento pelo MALDI-TOF ICMS (Figura 1), e, portanto, poderia garantir a melhor representação de todo grupo.

Os isolados avaliados adicionalmente por biologia molecular foram URM 3621 e URM 3627. Estes isolados foram identificados como *C. albicans* através MALDI-TOF ICMS (Figura 1), ao qual tiveram essa identificação ratificada pela biologia molecular.

Os isolados URM 4261 e URM 3624 foram identificados como *C. parapsilosis* pela fenotipagem clássica e *C. tropicalis* pela técnica de MALDI-TOF ICMS (Figura 1). O isolado URM 4261 apresentou interessante perfil fenotípico em sua posição no dendograma pelo MALDI-TOF ICMS, localizando-se próximo entre os grupos de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Entretanto, ambos isolados, URM 4261 e URM 3624, também foram identificados como *C. tropicalis* através da análise molecular.

O isolado URM 3719 que foi identificado classicamente como *C. albicans* foi identificado e agrupado como *C. tropicalis* pelo MALDI-TOF ICMS (Figura 1). Esse resultado foi corroborado também pela análise molecular.

Finalmente, o isolado URM 4608 o qual foi identificado como *C. parapsilosis* através da abordagem clássica não foi identificado pelo MALDI-TOF ICMS, nem localizado próximo ao agrupamento de *C. parapsilosis* no dendograma (Figura 1). Em seguida, foi avaliado por biologia molecular e identificado como *C. haemulonii*. Esta informação foi posteriormente adicionada a base de dados e o dendograma já apresenta a identificação da referida espécie.

Menos de um terço (26,8%) das amostras analisadas através da taxonomia clássica discordou da identificação realizada por MALDI-TOF ICMS. Os resultados do MALDI-TOF ICMS foram solidamente apoiados pela análise da biologia molecular. Através destas duas abordagens complementares identificações pertencentes aos gêneros *Candida* e *Issatchenkia* foram adicionadas. O primeiro continha um isolado de *C. haemulonii* e o último continha cinco isolados de *I. orientalis*. Isso indica que a técnica de MALDI-TOF ICMS é uma poderosa ferramenta para identificar leveduras de casos clínicos.

A utilização de proteínas ribossomais, moléculas que podem ser facilmente usados como biomarcadores, no MALDI-TOF ICMS faz com que a confiabilidade desta técnica seja próxima de 100%. MALDI-TOF ICMS é uma técnica simples e rápida, além de apresenta potencial para discriminar espécies estreitamente relacionadas, tais como *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, que são possíveis de serem diferenciadas por outras metodologias como biologia molecular e Fourier Transform

Infrared (Santos et al. 2010B). Contudo, devido a imensurável variabilidade biológica, até mesmo dentro de uma única espécie de levedura, a disponibilidade de um extenso banco de dados é necessária. Como exemplo, MALDI-TOF ICMS foi poderoso o suficiente para gerar um espectro característico do isolado URM 4608 (*C. haemulonii*) que o separa dos outros no dendrograma, entretanto, o banco de dados não foi experiente o suficiente para identificar corretamente a referida levedura.

O tempo de análise por amostra obtida por essa técnica é cerca de 30 segundos. Essa característica garante vantagens frente outros métodos de identificação, uma vez que o reconhecimento do patógeno é um importante determinante das taxas de mortalidade relacionada à infecção em pacientes hospitalizados.

Os perfis de sensibilidade de AmpB e FLU contra estes isolados também foram avaliados no intuito de fornecer informações com relevância clínica. O perfil de sensibilidade obtido nesse estudo foi validado através do uso da linhagem de referência ATCC 22019 que apresentou CIM igual a 0,5 µg/mL e 8 µg/mL para AmpB e FLU, respectivamente (Tabela 2).

Os resultados obtidos a partir desses dados (Tabela 2) mostram que ambos os agentes antifúngicos apresentam uma ampla gama de atividades contra todas os 41 isolados analisados. Um total de 92,68% e 60,98% dos isolados foram consideradas sensíveis *in vitro* para AmpB e ao FLU, uma vez que apresentaram $CIM \leq 1 \mu\text{g/mL}$ e $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em contrapartida, 21,95% das amostras foram resistentes ao FLU apresentando $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$.

De maneira geral, os 41 isolados foram muito mais sensíveis a AmpB que ao FLU. *I. orientalis* foi o grupo que apresentou maior resistência a ambos agentes antifúngicos. Este padrão foi seguido pelos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. É evidente que, em alguns casos, isolados com longos períodos de preservação tem mostrado maior resistência aos agentes antifúngicos que outros recentemente estocados. *C. albicans* URM 3716 depois de 10 anos apresentou o maior MIC para AmpB (1 µg/mL) e *I. orientalis* apresentou padrões variáveis para FLU (16 e 64 µg/mL) ao longo de 52 anos de preservação. Isto sugere que os traços de resistência dessas espécies é muito mais linhagem específica que influenciado pelo tempo de preservação.

Em conclusão, a abordagem fenotípica clássica, incluindo VITEK, são importantes na rotina laboratorial dos centros de saúde e hospitais. Entretanto, está

associada a um significativo grau de erros na identificação (Lockhart et al. 2008, Marklein et al. 2009, Putignani et al., 2010) e deve ser apoiada por um rápido, confiável e precisa abordagem, como MALDI-TOF ICMS. Desta forma, MALDI-TOF ICMS é um candidato potencial para agregar valor à abordagem clássica na identificação fenotípica de leveduras clínica.

Agradecimentos

Investigação que conduziram a estes resultados receberam financiamento do European Community's Seventh Framework Program (FP7, 2007e2013), Research Infrastructures Action, sob o acordo n ° FP7-228310 (projeto EMbaRC) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES / Brasil). Os autores agradecem a Coleção de Culturas URM, UFPE, Brasil, para a doação dos isolados clínicos.

Referências Bibliográficas

- Cendejas-Bueno, E., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, R.L., Cuenca-Estrella, M. (2010) Identification of Pathogenic Rare Yeast Species in Clinical Samples: Comparison between Phenotypical and Molecular Methods. *J. Clin Microbiol* 48, 1895-1899.
- CLSI, 2008: Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA.
- Correia, A., Sampaio, P., James, S., Pais, C. (2006) *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 313–317.
- Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.M., Manfait, M., Sockalingum, G.D. (2005) Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 239-247.
- Holland, R.D., Wilkes, R.D., Ralli, F., Sutherland, R.D., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, Jr.J.O. (1996) Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10, 1227-1232.
- Latouche, G.N., Daniel, H.M. Lee, O.C., Mitchell, T.G., Sorrell, T.C., Comparison, W.M. (1997) Comparison of Use of Phenotypic and Genotypic Characteristics for

- Identification of Species of the Anamorph Genus *Candida* and Related Teleomorph Yeast Species. J Clin Microbiol, 35, 3171-3180.
- Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P., Chang, T.C. (2006) Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. J Clin Microbiol, 44, 693-699.
- Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2008) *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections. J Clin Microbiol, 46, 374-376.
- Marinach-Patrice, C., Fekkar, A., Atanasova, R., Gomes, J., Djamdjian, L., Brossas, J.Y., Meyer, I., Buffet, P., Snounou, G., Datry, A., Hennequin, C., Golmard, J.L., Mazier, D. (2010) Rapid Species Diagnosis for Invasive Candidiasis Using Mass Spectrometry. PLoS ONE, 5, 1-5.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horré, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.-G. (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol 47, 2912-2917.
- Medrano, D.J.A., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Rocha, M.F.G., Rabenhorst, S.H.B., Sidrim, J.J.C. (2006) Candidemia in A Brazilian Hospital: The Importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop S. Paulo, 48 17-20.
- Mozina, S.S., Raspor, P., (1997) Molecular Techniques for Food Identification in Food Processing. Food Technol Biotechnol, 35, 55-61.
- Putignani, L., Del Chierico, F., Onori, M., Mancinelli, L., Argentieri, M., Bernaschi, P., Coltella, L., Lucignano, B., Pansani, L., Ranno, S., Russo, C., Urbani, A., Federicib, G., Menichella, D. (2010) MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. Mol. BioSyst. Online publication, DOI: 10.1039/C0MB00138D.
- Qian, J., Cutler, J.E., Cole, R.B., Cai, Y. (2008) MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. Anal Bioanal Chem 392, 439–449.
- Santos, C., Paterson, R.M.R., Venâncio, A., Lima, N. (2010a) Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. J Appl Microbiol 108, 375–385.

- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010b) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterisation of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161, 168-175.
- Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E., Coleman, D.C. (1995) *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol* 141, 1507–1521.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A.R., Maiden, M.C.J., Odds, F. C. (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43, 284–292.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, E.J. (2010) High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin Microbiol*, 48, 900-907.
- White, T.J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a Guide for Methods and Applications*. Pp 315-322. Ed by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. Taylor. New York, Academic Press.

Tabela 1: Comparação entre os resultados da taxonomia classica e nova identificação por espectrometria de massa dos 41 isolados clínicos de *Candida* estudados.

Numero de registro (URM)	Estocagem (anos)	ID fenotípica clássica	ID por MALDI-TOF ICMS	Substrato de isolamento
4990	01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção vaginal
4987	01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção vaginal
4986	01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção vaginal
4820	02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Escamas ungueais
4819	02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Escamas ungueais
4817	02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Escamas ungueais
4609	03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sangue
4606	03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sangue
4388	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
4387	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
4386	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
4385	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
4384	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
4260	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
4127	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Escamas inguinal
4126	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Urina
4125	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Escarro
4124	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Secreção orofaríngea
3719	10	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	Dentina
3716	10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Dentina
4802	02	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	*
4263	05	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Secreção orofaríngea
1059	48	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	*
934	49	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Biópsia de apêndice
109	52	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	*
4984	01	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Secreção vaginal
4970	01	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Secreção vaginal
4889	02	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue
4818	02	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Escamas ungueais
4804	02	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	IFM
4608	03	<i>C. parapsilosis</i>	<i>unidentified</i>	Sangue
4607	03	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue
4261	05	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Secreção orofaríngea
3627	12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	Escarro
3624	12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Escarro
3621	12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	Escarro
4790	02	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Farinha de mandioca
4262	06	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Secreção orofaríngea
1150	46	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Lingua
933	49	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Secreção vaginal
916	49	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Fezes

* Substrato não identificado; ID – Identificação

Tabela 2. Atividade antifúngica da anfotericina B e fluconazol frente aos isolados de *Candida* analisados.

Número de registro (URM)	Estocagem (anos)	ID dos isolados	CIMs (µg/mL)	
			AmpB	FLU
4990	01	<i>C. albicans</i>	0,25	>64
4987	01	<i>C. albicans</i>	0,25	16
4986	01	<i>C. albicans</i>	0,25	16
4820	02	<i>C. albicans</i>	0,5	4
4819	02	<i>C. albicans</i>	0,5	4
4817	02	<i>C. albicans</i>	0,5	4
4609	03	<i>C. albicans</i>	0,5	4
4606	03	<i>C. albicans</i>	0,25	2
4388	05	<i>C. albicans</i>	0,25	>64
4387	05	<i>C. albicans</i>	0,125	2
4386	05	<i>C. albicans</i>	0,25	1
4385	05	<i>C. albicans</i>	0,25	2
4384	05	<i>C. albicans</i>	0,06	2
4260	05	<i>C. albicans</i>	0,06	2
4127	07	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
4126	07	<i>C. albicans</i>	0,125	0,5
4125	07	<i>C. albicans</i>	0,06	0,5
4124	07	<i>C. albicans</i>	0,25	>64
3719	10	<i>C. tropicalis</i>	2	64
3716	10	<i>C. albicans</i>	1	0,5
4802	02	<i>I. orientalis</i>	2	64
4263	05	<i>I. orientalis</i>	0,125	64
1059	48	<i>I. orientalis</i>	0,125	16
934	49	<i>I. orientalis</i>	2	64
109	52	<i>I. orientalis</i>	0,5	16
22019 ^a	-	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	16
4984	01	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	16
4970	01	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	2
4889	02	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	4
4818	02	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	8
4804	02	<i>C. parapsilosis</i>	1	16
4608	03	<i>C. haemulonii</i>	0,5	4
4607	03	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	>64
4261	05	<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,5
3627	12	<i>C. albicans</i>	0,06	0,5
3624	12	<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,5
3621	12	<i>C. albicans</i>	0,5	8
4790	02	<i>C. tropicalis</i>	1	32
4262	06	<i>C. tropicalis</i>	0,5	4
1150	46	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>64
933	49	<i>C. tropicalis</i>	0,125	4
916	49	<i>C. tropicalis</i>	0,125	4

^aLinhagem ATCC; ID = Identificação

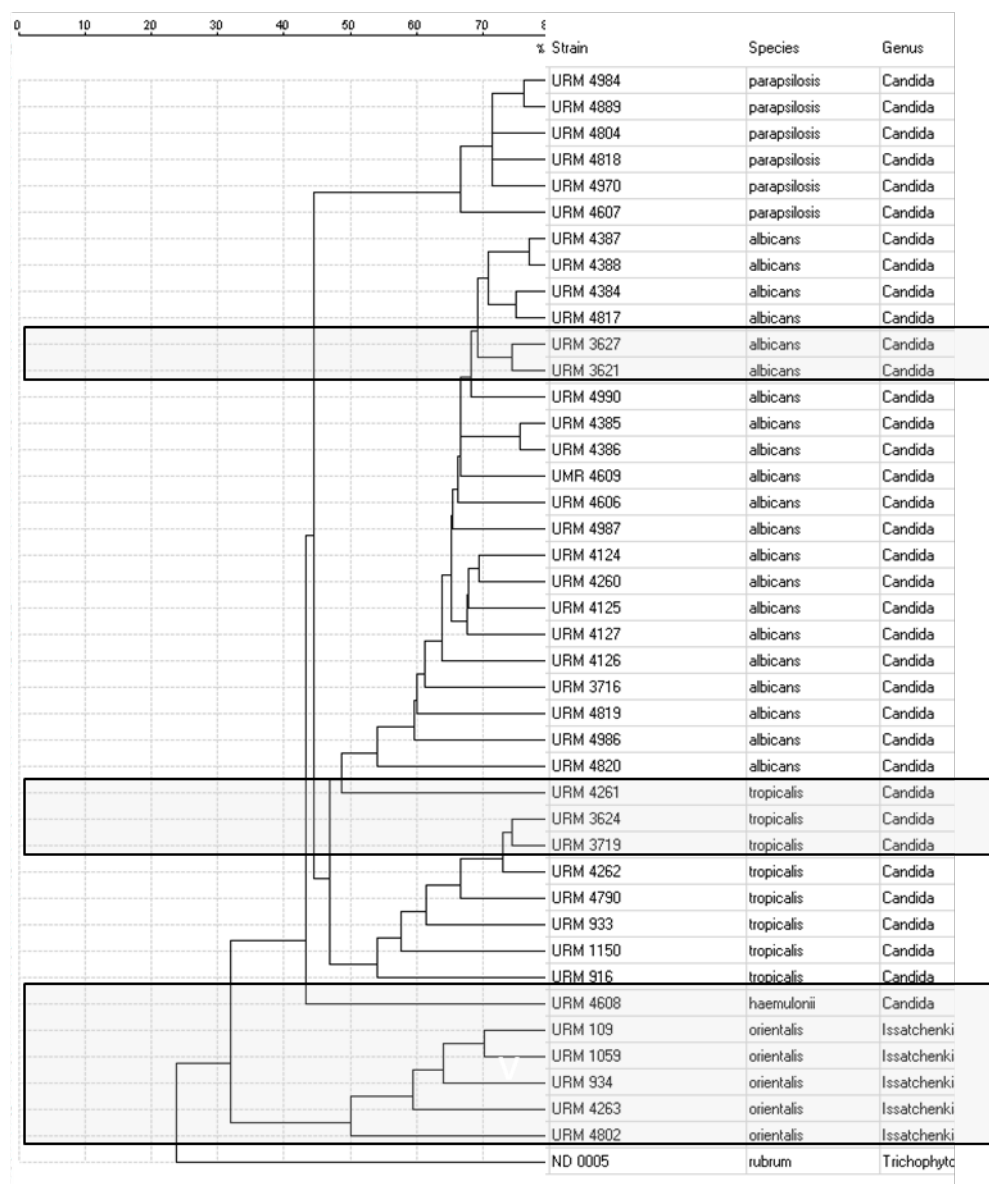


Figura 1. Dendrograma baseado nos espectros dos isolados analisados. Os retângulos em destaque referem-se aos isolados que apresentaram discrepância entre a identificação clássica e análise pelo MALDI-TOF ICMS. O dendrograma mostra a identificação polifásica utilizada nesse estudo: taxonomias clássica, proteômica através do MALDI-TOF ICMS e sequenciamento de regiões ITS. *Trichophyton rubrum* foi utilizado como controle externo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelson, J. A.; Moore, T.; Bruckner, D.; Deville, J.; Nielsen, K. 2005. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric patients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics* 116, 61-67.
- Abu-Lila, A. S.; Kizuki, S.; Doi, Y.; Suzuki, T.; Ishida, T.; Kiwada, H. 2009. Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. *Journal of Controlled Release* 137, 8-14.
- Adler-Moore, J. 1994. AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant* 14, 3-7.
- Almirante, B.; Rodríguez, D.; Cuenca-Estrella, M.; et al. 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of candida parapsilosis bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1681-1685.
- Alves, P. M.; Queiroz, L. M. G.; Pereira, J. V.; Pereira, M. S. V. 2009. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42, 2, 222-224.
- Arendrup, M. C.; Fuursted, K.; Gahrn-Hansen, B.; et al. 2005. Seminal surveillance of fungemia in denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4434-4440.
- Asai, K.; Tsuchimori, N.; Okonogi, K.; Perfect, J. R.; Gotoh, O.; Yoshida, Y. 1999. Formation of azole-resistant *candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase p450. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 5, 1163-1169.
- Baddley, J. W.; Patela, M.; Jones, M.; Cloud, G.; Smith, S. C.; Moser, S. A. A. 2004. Utility of real-time antifungal susceptibility testing for fluconazole in the treatment of candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50, 119-124.
- Bandeira, M. A. M. 2000. Identificação de chalconas diméricas nos brotos e renovações de aroeira-do-sertão (*myracrodruon urundeuva* all.). in: *Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. 193.
- Bankova, V.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
- Barchiesi, F.; Najjar, L. K.; Luther, M. F.; Scalise, G.; Rinaldi, M. G.; Graybill, J. R. 1996. Variation in fluconazole efficacy for *candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with aids in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 1317-1320.
- Barnett, J. A.; Paine, R. W.; Yarrow, D. 2000. Yeasts: characteristics and identification. *Cambridge University Press*.
- Batista, C. M.; Carvalho, C. M. B.; Santos-Magalhães, N. S. 2007. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 43, 167-179.

- Belmares, J.; Colaizzi, L.; Parada, J. P.; Johnson, S. 2005. Caspofungin treatment failure in a patient with invasive candidiasis and concomitant rifampicin treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 261-265.
- Bonini, C.; Chiummiento, L.; De Bonis, M.; Funicello, M.; Lupatelli, P. 2004. Synthesis of a first thiophene containing analog of the hiv protease inhibitor nelfinavir. *Tetrahedron Letters* 45, 13, 2797-2799.
- Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; et al. 2002. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3, 797-807.
- Brion, L. P.; Uko, S. E.; Goldman, D. L. 2007. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. *Journal of Infection* 54, 6, 521-529.
- Brito, E. H.; Fontenelle, R. O.; Brilhante, R. S.; et al. 2007. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *candida* spp. and *malassezia pachydermatis* strains from dogs. *Veterinary Journal* 174, 1, 147-153.
- Campisi, G.; Pizzo, G.; Milici, M. E.; Mancuso, S.; Margiotta, V. 2004. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. *Oral Medicine* 93, 281-286.
- Cardoso, M. L. C. 1998. *Malva sylvestris* linn. *Revista Plantas em Destaque* 8, 50.
- Castro, T. L.; Coutinho, H. D. M.; Gedeon, C. C.; Santos, J. M.; Santana, W. J.; Souza, L. B. S. 2006. Mecanismos de resistência de *candida* spp. a antifúngicos. *Infarma* 18, 9-10.
- Cavaleiro, C.; Pinto, E.; Gonçalves, M. J.; Salgueiro, L. 2006. Antifungal activity of *juniperus* essential oils against dermatophyte, *aspergillus* and *candida* strains. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1333-1338.
- Ceh, B.; Winterhalter, M.; Frederik, P. M.; Vallner, J. J.; Iasic, D. D. 1997. Stealth® liposomes: from theory to product. *Advanced drug delivery reviews* 24, 165-177.
- Chapman, R. L. 2003. *Candida* infections in the neonate. *Current Opinion in Pediatrics* 15, 1, 97-102.
- Chavanete, P.; Lopez, J.; Grappin, M.; et al. 1994. Cross-sectional study of the susceptibility of *candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in hiv-infected patients. *Aids* 8, 945-950.
- Chobot, V.; Buchta, V.; Jahodárova, H.; et al. 2003. Antifungal activity of a thiophene polyine from *leuzea carthamoides*. *Fitoterapia* 74, 3, 288-290.
- Chong, P. P.; Abdul Hadi, S. R.; Lee, Y. L.; et al. 2007. Genotyping and drug resistance profile of *candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. *Infection, Genetics and Evolution* 7, 4, 449-456.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA.
- Colombo, A. L. 1994. Avaliação *in vitro*, por três diferentes métodos, da sensibilidade de leveduras a antifúngicos azólicos. Tese de doutorado. *Escola Paulista de Medicina*.

- Colombo, A. L.; Barchiesi, F.; Mcgough, D. A.; Rinaldi, M. G. 1995. Comparison of etest and national comitte for clinical laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 535-540.
- Colombo, A. L.; Melo, A. S.; Crespo-Rosas, R. F.; et al. 2003. Outbreak of *candida rugosa* candidemia: An emerging pathogen that may be refractory to amphotericin b therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 46, 253-257.
- Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. 2006. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quimica Nova*, 29, 2, 287-292.
- Das, N. G.; Das, S. K. 2003. Controlled-release of orla dosage forms. *Formulation, Fill & Finish* 27, 10-16.
- Davis, M. E.; Chen, Z. G.; Shin, D. M. 2008. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 771-782.
- De Rosa, F. G.; Garazzino, S.; Pasero, D.; Di Perri, G.; Ranieri, V. M. 2009. Invasive candidiasis and candidemia: New guidelines. *Minerva Anestesiologica* 75, 7-8, 453-458.
- Day, R. 2005. Sertaconazole nitrate rapidly achieves high concentrations in the stratum corneum with prolonged retention time. *American Academy of Dermatology 63rd Annual Meeting*. New Orleans, la. poster, p.1829.
- Dorko, E.; Baranova, Z.; Jenca, A.; Kizek, P.; Pilipcinec, E.; Tkacikova, L. 2005. Diabetes mellitus and candidiasis. *Folia Microbiologica* 50, 3, 255-261.
- Dubé, M. P.; Heseltine, P. N.; Rinaldi, M. G.; et al. 1994. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *candida rugosa* in a burn unit. *Clinical Infectious Diseases*, 18, 72-82.
- Dupont, B.; Denning, D. W.; Marriot, D.; Sugar, A.; Viviani, M. A.; Sirisanthana, T. 1994. Mycosis in aids patients. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 32, 65-77.
- Edwards, K. A.; Baeumner, A. J. 2006. Analysis of liposomes. *Talanta* 68, 1432-1441.
- Emami, S.; Foroumadi, A.; Falahati, M.; et al. 2008. 2-hydroxyphenacyl azoles and related azolium derivatives as antifungal agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18, 141-146.
- Evans, E, G. 1998. Causative pathogens in onychomycosis and possibility of treatment resistance: a review. *Journal of The American Academy of Dermatology* 38, 32-56.
- Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Estevinho, L. M.; Queiroz, M. J. R. P. 2004. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophene series: a structure–activity evaluation study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14, 23, 5831-5833.
- Frézard, F.; Demicheli, C.; Schetini, D. A.; Rocha, O. G. F. 2005. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimónio. *Química Nova* 28, 511-518.
- Fridkin, S. K. 2005. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clinical Infectious Diseases* 41, 1455-1460.

- Fokialakis, N.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O.; Skaltsounis, A. L.; Wedge, D. E. 2006. Antifungal activity of thiophenes from *echinops ritro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5, 1651-1655.
- Forrest, G. 2006. Role of antifungal susceptibility testing in patient management. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19, 538-543.
- Foster, K. W.; Ghannoum, M. A.; Elewski, B. E. 2004. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the united states from 1999 to 2002. *Journal of The American Academy of Dermatology* 50, 5, 748-752.
- Gabizon, A.; Goren, D.; Horowitz, A. T.; Tzemach, D.; Lossos, A.; Siegal, T. 1997. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. *Advanced drug delivery reviews* 24, 337-344.
- Gavaldà, J.; Martín, M. T.; López, P.; et al. 2005. Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 3028-3030.
- Gonzalez, G. M.; Tijerina, R.; Najvar, L. K.; et al. 2001. Correlation between antifungal susceptibilities of *coccidioides immitis in vitro* and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1854-1859.
- Gonzalez, J. L.; Stephens, C. E.; Wenzler, T.; et al. 2007. Synthesis and antiparasitic evaluation of bis-2,5-[4-guanidinophenyl]thiophenes. *European Journal of Medicinal Chemistry* 42, 552-557.
- Graumann, P.; Marahiel, M. A. 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Archives of Microbiology* 166, 5, 293-300.
- Grimett, M. R. 1979. *Comprehensive organic chemistry*. Pergamon Press, UK. p. 357.
- Gudlaugsson, O. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases* 37, 1172-1177.
- Gulati, M.; Grover, M.; Singh, S.; Singh, M. 1998. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 165, 129-168.
- Gupta, N.; Mittal, N.; Sood, P.; Kumar, S.; Kaur, R.; Mathur, M. D. 2001. Candidemia in neonatal intensive care unit. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 44, 1, 45-48.
- Hawkins, J. L.; Baddour, L. M. 2003. *Candida lusitaneae* infections in the era of fluconazole availability. *Clinical Infectious Diseases* 36, 2, 14-18.
- Hernandez, S.; Gonzalez, G. M.; McCarthy, D. I.; et al. 2004. Alternatives to amphotericin b for *candida rugosa* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 477-480.
- Heurtaut, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.; Benoit, J. 2003. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24, 4283-4300.
- Hirasawa, M.; Takada, K. 2004. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 225-229.
- Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M. J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, Utrecht.

- Hossain, M. A.; Ghannoum, M. A. 2000. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opinion in Investigation of Drugs* 9, 1797-1813, 2000.
- Ibañez, E.; Cifuentes, A. 2001. New Analytical Techniques in Food Science. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 41, 413-450.
- Ishihara, K.; Tsujino, R.; Hamada, M.; Toyoda, N.; Iwasaki, Y. 2002. Stabilized liposomes with phospholipid polymers and their interactions with blood cells. *Colloids and surfaces* 25, 325-333.
- Jandourek, A.; Vaishampayan, J. K.; Vasquez, J. A. 1998. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in aids patients. *Aids* 12, 1033-1037.
- Júlio O. F. M.; Claudio L. D.; Rodinei A.; Vitor F. F.; Maria C. B. V. S.; Maria L. G. F.; Anna C. C. (2006). Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Quimica Nova*. 29, 3, 569-579.
- Takeya, H.; Miyazaki, Y.; Miyazaki, H.; Nyswaner, K.; Grimberg, B.; Bennett, J. E. 2000. Genetic analysis of azole resistance in the darlington strain of *candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 11, 2985-2990.
- Kartal, M.; Yildiz, S.; Kaya, S.; Kurucu, S.; Topcu, G. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from to different regions of anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* 86, 69-73.
- Katiyar, S. K.; Edlind, T. D. 2001. Identification and expression of multidrug resistance-related abc transporter genes in *candida krusei*. *Medical Mycology* 39, 1, 109-116.
- Katritzky A. R.; Slavov, S. H.; Dobchev, D. A.; Qsar, K. 2008. M.m modeling of the antifungal activity against *candida albicans* for a diverse set of organic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16, 7055-7069.
- Kelsey, S. M.; Goldman, J. M.; McCann, S.; et al. 1999. Liposomal amphotericin (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Bone Marrow Transplant* 23, 163-168.
- Kim, S. H.; Tran, M. T.; Ruebsam, F.; et al. 2008. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of 1,1-dioxoisothiazole and benzo[b]thiophene-1,1-dioxide derivatives as novel inhibitors of hepatitis c virus ns5b polymerase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18, 14, 4181-4185.
- Klastersky, J. 2004. Empirical antifungal therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 105-112.
- Knoppert, D. C.; Salama, E. L. E.; Lee, D. S. 2001. Erradicacion of severe neonatal sistemics candidiasis with amphotericin b lipid complex. *The Annals of Pharmacotherapy* 35, 1032-1036.
- Koks, C. H.; Meenhorst P. L.; Bult, A.; Beijnen, J. H. 2002. Itraconazole solution: summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in hiv-infected persons. *Pharmacological Research* 46, 195-200.
- Kovacicova, G.; Hanzen, J.; Pisarcikova, M.; et al. 2001. Nosocomial fungemia due to amphotericin b-resistant *candida* spp. In three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. *Journal of Infection and Chemotherapy* 7, 1, 45-48.

- Krcmery, V.; Barnes, A. J. 2002. Non-*albicans candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* 50, 4, 243-260.
- Kreger-Van Rij, N. J. W. 1984. The yeasts: a taxonomic study, 3rd. Edn. *Elsevier Science Publishers*.
- Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-vaccari, E. M.; Melo, N. T. 2002. Tratado de micologia médica. *Sarvier*. 1104.
- Lasic, D. D. 1998. Novel applications of liposomes. *Tibtech* 16, 307-321.
- Li, X.; Ding, L.; Xu, Y.; Wang, Y.; Ping, Q. N. 2009. Targeted delivery of dextrorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. *International Journal of Pharmaceutics* 373, 116-123, 2009.
- Lira, M. C. B.; Siqueira-Moura, M. P.; Rolim-Santos, H. M. L.; Galetti, F. C. S.; Simioni, A. R.; Santos, N. P.; Egito, E. S. T.; Silva, C. L.; Tedesco, A. C.; Santos-Magalhaes, N. S. 2009. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *Journal of Liposome Research* 19, 49-58.
- Liu, F.; Liao, Q.; Liu, Z. 2006. Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 92, 43-47.
- Luna, B.; Drew, R. H.; Perfect, J. R. 2000. Agents for treatment of invasive fungal infections. *Otolaryngologic Clinics of North America* 33, 277-299.
- Marchetti, O.; Bille, J.; Fluckiger, U.; et al. 2004. Epidemiology of candidemia in swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clinical Infectious Diseases* 38, 311-320.
- Marinach-Patrice, C.; Fekkar, A.; Atanasova, R.; Gomes, J.; Djamdjian, L.; Brossas, J.Y.; Meyer, I.; Buffet, P.; Snounou, G.; Datry, A.; Hennequin, C.; Golmard, J.L.; Mazier, D. 2010. Rapid Species Diagnosis for Invasive Candidiasis Using Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 5, 1-5.
- Martín, M. T. M.; Gavalda, J.; López, P.; et al. 2003. Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 1032-1034.
- Martínez, M.; López-Ribot, J. L.; Kirkpatrick, W. R.; et al. 2002. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *candida albicans* clinical isolates from an hiv-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 3, 515-524.
- Martins, R. S.; Pereira, E. S.; Lima, S. M.; Senna, M. I.; Mesquita, R. A.; Santos, V. R. 2002. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *candida albicans* collected from hiv-seropositive and hiv-seronegative brazilian patients with oral candidiasis. *Journal of Oral Science* 44, 41-48.
- Mello, A. M.; Gomes, R. T.; Lara, S. R.; et al. 2006. The effect of brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida Albicans*. *Pharmacologyonline* 3, 352-358.
- Modo, G. J. 2001. Genitourinary infections fungal: an therapeutic. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2, 1211-1226.
- Mondello, F.; Bernardis, F.; Girolamo, A.; Salvatore, G.; Cassone, A. 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 1223-1229.

- Morgan, J.; Meltzer, M. I.; Plikaytis, B. D.; et al. 2005. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 26, 540-547.
- Morschhäuser J. 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Acta* 1587, 2-3, 240-248.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Reference method for broth dilution testing of filamentous fungi: Approved Standard Document M38-A. 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, PA, USA 19087-1898.
- New, R. R.; Chance, M. L.; Heath, S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in Liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 8, 371-381.
- Oliveira, R. D. R.; Maffei, C. M. L.; Martinez, R. 2001. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *candida*. *Revista Associação de Medicina Brasileira* 47, 231-235.
- Ostrosky-Zeichner, L.; Marr, K. A.; Rex, J. H.; Cohen, S. H. 2003. Amphotericin B: time for new gold standart. *Clinical Infectious Diseases* 37, 415-425.
- Ota, C.; Unterkircher, C.; Fantinato, V.; Fhimizu, M. T. 2001. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 44, 375-378.
- Ozawa, H.; Okabayashi, K.; Kano, R.; Watari, T.; Watanabe, S.; Hasegawa, A. 2005. Rapid identification of *Candida Tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia* 160, 2, 159-162.
- Panoff, J. M.; Thammavongs, B.; Guéguen, M. 2000. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus Delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* cip 101027t. *Cryobiology* 40, 3, 264-269.
- Pappalardo, M. C. S. M.; Melhem, M. S. C. 2003. *Cryptococcosis*: a review of the brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 45, 8866-8871.
- Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D.; et al. 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious Diseases* 37, 634-643.
- Park, B. J.; Park, J. C.; Taguchi, H.; Fukushima, K.; Hyon, S. H.; Takatori, K. 2006. Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-o-gallate (EGCG) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347, 401-405.
- Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; et al. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2, 751-60.
- Perea, S.; López-Ribot, J. L.; Kirkpatrick, W. R.; et al. 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 10, 2676-2684.
- Pereira L.; Dias, N.; Santos, C.; Lima, N. 2010. MALDI-TOF ICMS: Capability, Potentiality and Limits in the Fast Identification of *Trichophyton Rubrum* from Clinical Cases Occurrence in Portuguese Health Centres. *Clinical Microbiology and Infection*. 16, 2, 530, 1795.

- Perfect, J. R. 2004. Antifungal resistance: the clinical front. *Oncology* 18, 14 suppl. 13, 15-22.
- Perfect, J. R.; Cox, G. M. 1999. Drug resistance in *Cryptococcus Neoformans*. *Drug Resistance Updates* 259-269.
- Pfaller, M. A. 2005. Antifungal susceptibility testing methods. *Current Drug Targets* 6, 929-943.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Messer, S. A.; Boyken, L.; Huyhn, H.; Hollis, R. J. 2002. Clinical evaluation of a frozen commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of seven antifungal agents, including the new triazoles posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1694-1697.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Sheehan, D. J. 2006. Interpretive breakpoints for fluconazole and *candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 435-447.
- Pfaller, M. A.; Jones, R. N.; Messer, S. A.; et al. 1998. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the scope program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 31, 327-332.
- Pfaller, M. A.; Messera, S. A.; Boykena, L.; et al. 2004. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48, 201-205.
- Pfaller, M. A.; Rhine-Chalberg, J.; Redding, S. W.; Smith, J.; Farinacci, G.; Fothergill, A.W.; Rinaldi, M. G. 1994. Variations in fluconazole susceptibility and eletrophoretic kariotype among oral isolates of *Candida Albicans* from patients with aids and oral candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 59-64.
- Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. G.; Pinto, E.; et al. 2004. Antifungal activity of *thymus* oils and their major compounds. *Journal of The European Academy of Dermatology* 18, 73-78.
- Pinto, A. C. & Bicca, R. A. (Eds.). (1999). Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.; Ferreira, M. L. G.; Cunha, A. C.; Heterociclos Contendo o Núcleo Triazólico: Métodos de Síntese, Reatividade e Atividade Biológica. *Cadernos do Instituto de Química - UFRJ*.
- Pinto, E.; Pina-Vaz, C.; Salgueiro, L. R.; et al. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and Dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 55, 1367-1373.
- Pinto, E.; Queiroz, M. J. R. P.; Vale-Silva, L. A.; et al. 2008. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16, 17, 8172-8177.
- Pinto, E.; Palmeira, A.; Salgueiro, L.; et al. 2003. Antifungal activity of oregano oils (*lippia graveolens* and *origanum virens*) on dermatophyte species. *Clinical Microbiology and Infection* 1, suppl. 9, 222.

- Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A.; Couvreur, P. 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13, 155-168.
- Posteraro, B.; Tumbarello, M.; La Sorda, M.; et al. 2006. Azole resistance of *candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 8, 3046-3047.
- Putignani, L.; Del Chierico, F.; Onori, M.; Mancinelli, L.; Argentieri, M.; Bernaschi, P.; Coltella, L.; Lucignano, B.; Pansani, L.; Ranno, S.; Russo, C.; Urbani, A.; Federicib, G.; Menichella, D. 2010. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Molecular BioSystems Online publication*, DOI: 10.1039/C0MB00138D.
- Qian, J.; Cutler, J. E.; Cole, R. B.; Cai, Y. 2008. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 439-449.
- Randhawa, H. S. 2000. Respiratory and systemic mycosis: an overview. *The Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences* 42, 4, 207-219.
- Rando, D. G.; Doriguetto, A. C.; Silva, C. H. T. P.; et al. 2006. A duplicated nitrotyenyl derivative with antimycobacterial activity: synthesis, x-ray crystallography, biological and mutagenic activity tests. *European Journal of Medicinal Chemistry* 41, 10, 1196-1200.
- Rex, J. H.; Pfaller, M. A. 2002. Has antifungal susceptibility testing come of age. *Clinical Infectious Diseases* 35, 982-989.
- Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Rinaldi, M. 1995. Resistance of *candida* species to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 1-8.
- Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Walsh, T. J.; et al. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Review* 14, 643-658.
- Richet, H.; Roux, P.; Des Champs, C.; Esnault, Y.; Andremont, A. 2002. Candidemia in french hospitals: incidence rates and characteristics. *Clinical Microbiology and Infection* 8, 405-412.
- Rodrigues-Tudela, J. L.; Martine-Difez, F.; Cuenca-Estrella, M.; Rodero, L.; carpinteiro, y.; gorgojo, b. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing *cryptococcus neoformans*: comparison of the nccls standard m27-a médium, buffered yeast nitrogen base, and rpmi 2% glucose. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 400-404.
- Roilides, E.; Farmaki, E.; Evdoridou, J.; et al. 2004. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility and molecular typing of causative isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23, 10, 745-750.
- Ryu, C. K.; Lee, S. K.; Han, J. Y.; Jung, O. J.; Lee, J. Y.; Jeong, S. H. 2005. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[b]thiophenes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 15, 10, 2617-2620.
- Salgueiro, L. R.; Cavaleiro, C.; Pinto, E.; et al. 2003. Chemical species. *Planta Medica* 69, 871-874.

- Salgueiro, L.; Pinto, E.; Gonçalves, M. J.; et al. 2004. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *thymbra capitata*. *Planta Medica* 70, 572-575.
- Sakata, S.; Uchida, K.; Kaetsu, I.; Kita, Y. 2007. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry* 76, 733-737.
- Samuni, A. M.; Lipman, A.; Barenholz, Y. 2000. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. *Chemistry and physics of lipids* 105, 121-134.
- Sanglard, D.; Odds, F. C. 2002. Resistance of candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases* 2, 2, 73-85.
- Santos, C.; Paterson, R. M. R.; Venâncio, A.; Lima, N. 2010. Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*. 108, 375-385.
- Santos, F. A.; Cunha, G. M. A.; Viana, G. S. B. 1998. Antibacterial activity of essencial oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. *Phytoterapy Research* 12, 24-27.
- Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. 2002. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química Nova* 25, 1181-1185.
- Santos, V. R.; Gomes, R. T.; Mesquita, R. A.; et al. 2008. Efficacy of brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytotherapy Research* 22, 1544-1547.
- Savva, M.; Torchilin, V. P.; Huang, L. 1999. Effect of grafted amphiphilic pvp-palmytil polymers on the thermotropic phase behavior of 1,2 dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayer. *J. Colloid. Interface sci* 217, 166-171.
- Shama, S.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. 2005. Copper(ii) complexes with substituted thiosemicarbazones of thiophene-2-carboxaldehyde: synthesis, characterization and antiamoebic activity against *e. Histolytica*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 40, 12, 1414-1419.
- Sharma, A.; Sharma, U. S. 1997. Liposome in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, amsterdam 154, 123-140.
- Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. 2004. Micologia médica à luz de autores contemporâneos 265-273.
- Smith, D.; Midgley, J.; Gazzard, B. 1999. A randomised, double-blind study of itraconazole versus placebo in the treatment and prevention of oral or oesophageal candidosis in patients with hiv infection. *International Journal of Clinical Practice* 53, 349-352.
- Sperry, P. J.; Cua, D. J.; Wetzel, A.; Adler-Moore, P. 1998. Antimicrobial activity of ambisome and non-liposomal amphotericin b following uptake of *candida glabrata* by murine epidermal langerhans cells. *Medical Mycology* 36, 135-141.

- Stone, J. A.; Migoya, E. M.; Hickey, L.; et al. 2004. Potential for interactions between caspofungin and nelfinavir or rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 4306-4314.
- Takemoto, K.; Yamamoto, Y.; Ueda, Y.; et al. 2006. Comparative study on the efficacy of Ambisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 724-731.
- Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Toyoda, T.; Toyobuku, H.; Hino, T.; Kawashima, Y. 1998. Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol. *International Journal of Pharmaceutics* 164, 103-111.
- Takeuchi, H.; Kojima, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. 2000. Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and res uptake in rats. *Journal Controlled Release* 68, 195-201.
- Torchilin, V. P. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Review Drug Discovery* 4, 145-160.
- Torres, J.; Marquez, M.; Camps, F. 2000. Sertaconazole in the treatment of mycoses: from dermatology to gynecology. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 71, 3-20.
- Traeder, C.; Kowoll, S.; Araste, H. K. 2008. *Candida* infection in hiv positive patients 1985-2007. *Mycoses* 51, suppl. 2, 58-61.
- Vanden Bossche, H.; Engelen, M.; Rochette, F. 2003. Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 1, 5-29.
- Vandeputte, P.; Larcher, G.; Bergès, T.; Renier, G.; Chabasse, D.; Bouchara, J. P. 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida Tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy* 49, 11, 4608-4615.
- Varanasi, N. L.; Baskaran, I.; AlagadenL, G. J.; Chandrasekar, P. H.; Manavathu, E. K. Novel effect of voriconazole on conidiation of *Aspergillus* species. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 72-79.
- Vemuri, S.; Rhodes, C. T. 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta. Helv* 70, 95-111.
- Veen, S. Q.; Claas, E. C. J.; Kuijper, E. J. 2010. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 900-907.
- Viudes, A.; Cantón, E.; Pemán, J.; López-Ribot, j. L.; Gobernado, M. 2002. Correlation between in vitro susceptibility to antifungal drugs and the clinical evolution of patients with candidiasis and cryptococcosis. *Revista Espanhola de Quimioterapia* 15, 1, 32-42.
- Wagner, V.; Dullaart, A.; Bock, A. K.; et al. 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* 24, 1211-1217.
- Walsh, T. J.; Goodman, J. L.; Pappas, P.; et al. 2001. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 3487–3596.

- Wang, J.; Sporns, P. 1999. Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *Journal Of Agriculture And Food Chemistry*. 47, 2009-2015.
- Watanabe, S. 2008. Dermatomycosis – classification, etiology, pathogenesis ad treatment. *Nippon Rinsho* 66, 12, 2285-2289.
- Wenzel, R. P.; Pfaller, M. A. 1991. Infection control: the premier quality assessment program in united states hospitals. *The American Journal of Medicine* 91, 3b, 27-31.
- White, D. J.; Habib, A. R.; Vanthuyne, A.; Langford, S.; Symonds, M. 2001. Combined topical flucytosine and amphotericin b for refractory vaginal *candida glabrata* infections. *Sexually Transmitted Infections* 77, 212-213.
- Williams, D. A.; Lemke, T. L. 2002. Foye's principles of medicinal chemistry. 5th edn. Philadelphia: *Lippincot Williams & Wilkins* 1114.
- Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S. M.; Seifert, H.; Wenzel R. P.; Edmond, M. B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39, 309-317.
- Yanagida, A. 2000. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of *Mutans streptococci*. *Journal Agricola Food Chemical* 48, 5666-5671.
- Zaoutis, T. E.; Argon, J.; Chu, J.; Berlin, J. A.; Walsh, T. J.; Feudtner, C. 2005. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the united states: a propensity analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 1232-1239.
- Zhang, L.; Pornpattananangkul, D.; Hu, C. M. J. et al. 2010. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry* 17, 585-594.
- Zhang, L.; Granick, S. 2006. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles). *Nano Letters* 6, 694-698.
- Zhang, L.; GU, F. X.; Chan, J. M.; et al. 2008. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 83, 761-769.
- Zsolt, I. 2002. Sertaconazole: a clinical update. Proceedings of sertaconazole international symposium. La Toja, Spain, *Prous Science* 29-32.

8 CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Derivados de 2-(amino-substituídos)-4,5-dialquil-tiofeno-3-carbonitrila apresentam moderada atividade antifúngica frente a isolados clínicos de *Candida*.
2. Anel de cicloalquil ligado ao anel tiofeno é essencial para que ocorra atividade antifúngica.
3. Anel ciclohexila otimiza o potencial antifúngico de derivados tiofenos.
4. Derivados 2-[1-aryl-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propano-2-ol possuem moderada atividade antifúngica frente aos isolados clínicos de *Candida* com CIM a partir de 64 µg/mL.
5. Derivado 1,2,3-triazol com cloro *para* substituído em átomo de N-1 apresenta maior eficiência antifúngica com CIM entre 64 a 256 µg/mL.
6. Nanoencapsulação de 1,2,3-triazol cloro substituído em formulação lipossomal apresenta excelente estabilidade e características físico-químicas adequadas aos parâmetros farmacológicos.
7. A formulação lipossomal que apresenta densidade eletrônica negativa otimiza a especificidade e a afinidade por isolados clínicos de *Candida*.
8. Modelo experimental de candidíase tratado com 1,2,3-triazol cloro substituído encapsulado em lipossomas aumenta a taxa de sobrevivência dos cobaias, quando comparado ao tratamento com fluconazol como fármaco padrão.
9. Espectrometria de massa, através da técnica de MALDI-TOF ICMS, utilizada para identificação dos isolados apresenta discrepância de 26,8% em relação a identificação taxonômica clássica, entretanto foi ratificada pela análise molecular de regiões ITS.
10. Análise proteômica pela técnica espectral MALDI-TOF ICMS requer expansão da diversidade microbiana em seu banco de dados para uma identificação verossímia dos isolados avaliados.

ANEXOS
(MANUSCRITOS SUBMETIDOS)

Evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives

Reginaldo G. Lima-Neto,^a Francisco J. B. Mendonça Junior,^{b,c*} Tiago B. de Oliveira,^d Valéria R. A. Pereira,^e Maria C. A. de Lima,^d Ivan R. Pitta,^d Suelly L. Galdino,^d Rayssa M. D. da Cruz,^a Rodrigo S. A. de Araújo^a & Rejane P. Neves^a

^a Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-910, Brazil

^b Laboratório de Síntese e Vetorização de Substâncias Bioativas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa 58.020-540, Brazil;

^c Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal, 5009, João Pessoa 58051-970, Brazil;

^d Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-910, Recife-PE, Brazil;

^e Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, Recife-PE;

Abstract—In the present communication, we report the synthesis of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives (**3a-g**, **4a-h**). All synthesized compounds were screened for their *in vitro* antifungal activity against 42 clinical isolates of *Candida* and 2 isolates of *Cryptococcus* representing five different species (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. neoformans*), compared to fluconazole and amphotericin B as standard agents. Most of the compounds showed moderate or poor antifungal activity with high MFC values (800-3,200 µg/mL). The compound **4d** was the most active with MFC values varying between 100-800 µg/mL. Preliminary SAR study demonstrated that the presence of a cycloalkyl ring linked to the thiophene moiety is essential for the antifungal activity, and the best candidates are cyclohexyl compounds **4d-f**. These compounds were also submitted to cytotoxic screening in the assay of incorporation of ³H-thymidine on BALB/c mice spleen cells, and they showed no cytotoxic effects in level doses less than 1 µg/mL. Results suggest that thiophene derivatives provide interesting compounds for antifungal drug development as well as be potent antifungal agents.

Key Words: antifungal activity, thiophene derivatives, cytotoxicity, *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*.

* Corresponding author. Fax: +55 61 33421414; e-mail: franciscojaime@pq.cnpq.br

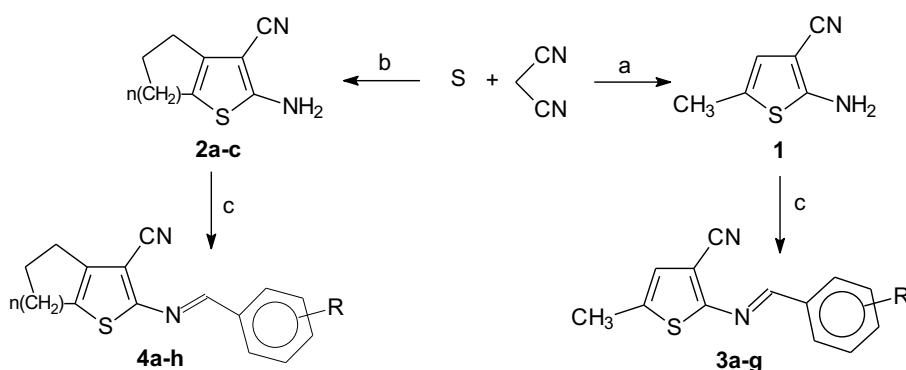
The incidence of invasive fungal infections caused by opportunistic pathogens, often characterized by high mortality rates, has increased progressively over the last three decades. Patients who become immunocompromised because of underlying diseases such as leukemia, tuberculosis or acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or patients who undergo chemotherapy or organ transplantation are particularly susceptible to opportunistic fungal infections.¹⁻⁶ Almost all of the major classes of antifungal with clinical application have developed resistance.⁷ Fungal resistance to the antimycotics available such as amphotericin B, flucytosine, polyenes, azoles (fluconazole, miconazole and voriconazole) and echinocandins (caspofungin), has become a major worldwide health problem.⁸⁻¹¹ A matter of concern in the treatment of fungal infections is the limited number of efficacious antimycotics drugs. Many of the currently available drugs are toxic, and have others drawbacks regarding their spectrum, tissue distribution, central nervous system penetration, and high cost.¹²⁻¹⁶ In addition, they produce usual recurrence because they are fungistatic and not fungicides, or lead to the development of resistance due in part to the prolonged periods of administration, and the widespread use of antimicrobial agents for prophylaxis and treatment.¹⁷⁻¹⁹

There is, therefore, a clear need for the discovery of new structures with antifungal properties, which could lead to the development of new drugs for the management of fungal infections and treatment of systemic and opportunistic mycoses. In this context, thiophene ring, found in some biologically active compounds, presents biological properties such as protozoal parasitic diseases,²⁰⁻²² antimicobacterial,²³ analgesic and anti-inflammatory,²⁴⁻²⁶ antitumor,²⁷⁻³⁰ antiviral³¹⁻³² and especially antifungal³³⁻³⁷ activities, turning this a

very attractive structure for medicinal chemists.

In this scenario we report the synthesis of new thiophene derivatives and the evaluation of their antifungal and cytotoxic activities *in vitro*, including Minimal Fungicidal Concentration (MFC) against four species of *Candida* (42 strains) and *Cryptococcus neoformans* (2 strains) with clinical relevance, using the macrodilution broth method.

The synthesis of the thiophene derivatives **3a-g** and **4a-h** was carried out via a two-step reaction, starting by the obtainment of 2-amino-5-methyl-thiophene-3-carbonitrile **1**³⁸ and 2-amino-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile, 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-4*H*-benzo[*b*]thiophene-3-carbonitrile and 2-amino-5,5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophene-3-carbonitrile **2a-c**³⁹ followed by condensation of them with substituted benzaldehydes affording the series: 2-[(substituted-benzylidene)-amino]-5-methyl-thiophene-3-carbonitrile **3a-g**⁴⁰, 2-[(substituted-benzylidene)-amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile **4a-c**, 2-[(substituted-benzylidene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4*H*-benzo[*b*]thiophene-3-carbonitrile **4d-f**⁴¹, 2-[(substituted-benzylidene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophene-3-carbonitrile **4g,h** (Scheme 1). Experimental details for this procedure are cited in references and notes.⁴²



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) propionaldehyde, Et₃N, DMSO, 0-20 °C; (b) cyclopentanone (or cyclohexanone or cycloheptanone), Et₃N, EtOH, rt; (c) ArCHO, acetic acid, EtOH, reflux.

The ¹H NMR spectra and microanalysis were consistent with the expected structures. Signals at 8.38-8.93 ppm were attributed to imine group (CH=N). Signals of the methyl group and H-4 of **3a-g** appear as an unexpected doublet with coupling constants at 1.2 Hz, evidencing the existence of a J₄ coupling. The analytical data of these compounds were presenting in Table 1.

Table 1. Chemical and Physical data of thiophene derivatives **3a-g**, **4a-h**

Compound	R	n	M.W.	Mp (°C)	R _f	(%) Yield
3a	2-NO ₂	-	271	177-179	0.64 ^a	86
3b	4-NO ₂	-	271	149-150	0.48 ^a	92
3c	4-OCH ₃	-	256	104-105	0.53 ^a	80
3d	4-N(CH ₃) ₂	-	269	153-154	0.44 ^a	98
3e	4-F	-	244	89-90	0.65 ^a	87
3f	2-indole	-	265	224-226	0.25 ^a	94
3g	4-OBz	-	332	143-145	0.67 ^a	90
4a	H	1	252	142-143	0.47 ^b	98
4b	4-Br	1	330	133-135	0.45 ^a	36
4c	4-Cl	1	286	140-140,5	0.54 ^b	89
4d	4-NO ₂	2	311	139-140	0.52 ^a	90
4e	4-Br	2	344	138-140	0.48 ^b	35
4f	4-Cl	2	300	135-136	0.47 ^b	99
4g	H	3	280	110-111	0.54 ^b	97
4h	4-Cl	3	314	104-105	0.50 ^c	92

^a eluent (7:3 Hex/AcOEt); ^b eluent (9:1 Hex/AcOEt); ^c eluent (9:1 MeOH/CHCl₃).

The *in vitro* antifungal activities of the synthesized compounds **3a-g** and **4a-h** were investigated using a total of 44 fungi strains, including four species of *Candida* (*C. albicans* (20 strains), *C. krusei* (5 strains), *C. parapsilosis* (12 strains) and *C. tropicalis* (5 strains)) and *Cryptococcus neoformans* (2 strains). These strains were supplied by the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Biological Sciences Centre of the Federal University of Pernambuco Brazil. MFC values were determined by microdilution

broth method in accordance with the guidelines of the CLSI⁴³ (formerly NCCLS)⁴⁴ which assures confident and reproducible results. The MFC values (µg/mL) for the different pathogenic fungi, in comparison with fluconazole and amphotericin B were summarized in Table 2.⁴⁴⁻⁴⁷

Table 2. Antifungal activity of compounds **4a-h**, fluconazole and amphotericin B against 44 fungi strains.

Tested strain n° URM	Compounds (MFCs in µg/mL) ^a								AmpB ^b	Flu ^c
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h		
<i>Candida albicans</i> 4990	1,600	1,600	1,600	200	400	800	1,600	1,600	0.25	>64
<i>C. albicans</i> 4987	1,600	1,600	1,600	200	400	800	1,600	1,600	0.25	16
<i>C. albicans</i> 4986	1,600	1,600	1,600	200	400	800	1,600	1,600	0.25	16
<i>C. albicans</i> 4820	1,600	1,600	1,600	800	800	800	1,600	1,600	0.5	4
<i>C. albicans</i> 4819	1,600	1,600	1,600	800	800	800	1,600	1,600	0.5	4
<i>C. albicans</i> 4817	1,600	1,600	1,600	800	800	800	1,600	1,600	0.5	4
<i>C. albicans</i> 4609	3,200	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	0.5	4
<i>C. albicans</i> 4606	3,200	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	0.25	2
<i>C. albicans</i> 4388	1,600	3,200	1,600	400	800	1,600	1,600	1,600	0.25	>64
<i>C. albicans</i> 4387	1,600	3,200	1,600	800	1,600	1,600	1,600	1,600	0.125	2
<i>C. albicans</i> 4386	1,600	3,200	1,600	400	800	1,600	1,600	1,600	0.25	1
<i>C. albicans</i> 4385	1,600	3,200	1,600	800	1,600	1,600	1,600	1,600	0.25	2
<i>C. albicans</i> 4384	1,600	3,200	1,600	800	1,600	1,600	1,600	1,600	0.06	2
<i>C. albicans</i> 4260	1,600	1,600	3,200	800	1,600	1,600	1,600	1,600	0.06	2
<i>C. albicans</i> 4127	1,600	1,600	3,200	800	1,600	1,600	1,600	1,600	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> 4126	1,600	1,600	3,200	800	800	1,600	1,600	1,600	0.125	0.5
<i>C. albicans</i> 4125	1,600	1,600	3,200	400	800	800	1,600	1,600	0.06	0.5
<i>C. albicans</i> 4124	1,600	3,200	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	0.25	>64
<i>C. albicans</i> 3719	1,600	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	2	64
<i>C. albicans</i> 3716	1,600	1,600	1,600	100	800	800	1,600	800	1	0.5
<i>C. krusei</i> 4802	1,600	1,600	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	2	64
<i>C. krusei</i> 4263	1,600	3,200	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	0.125	64
<i>C. krusei</i> 1059	1,600	1,600	3,200	100	1,600	1,600	3,200	1,600	0.125	16
<i>C. krusei</i> 934	1,600	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	2	64
<i>C. krusei</i> 109	1,600	1,600	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	0.5	16
<i>C. parapsilosis</i> 4984	1,600	1,600	1,600	200	400	800	1,600	1,600	0.25	16
<i>C. parapsilosis</i> 4970	1,600	1,600	1,600	800	800	800	1,600	800	0.25	2
<i>C. parapsilosis</i> 4889	1,600	1,600	1,600	800	800	800	1,600	1,600	0.5	4
<i>C. parapsilosis</i> 4818	1,600	1,600	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	0.5	8
<i>C. parapsilosis</i> 4804	1,600	3,200	3,200	800	1,600	800	3,200	1,600	1	16
<i>C. parapsilosis</i> 4608	1,600	3,200	3,200	800	1,600	800	3,200	1,600	0.5	4
<i>C. parapsilosis</i> 4261	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	0.125	>64
<i>C. parapsilosis</i> 3627	1,600	1,600	3,200	400	800	800	1,600	1,600	0.06	0.5
<i>C. parapsilosis</i> 3624	1,600	1,600	3,200	400	800	800	1,600	1,600	0.06	0.5
<i>C. parapsilosis</i> 3621	1,600	3,200	3,200	800	1,600	1,600	3,200	800	0.5	8
<i>C. tropicalis</i> 4790	1,600	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	1	32
<i>C. tropicalis</i> 4262	1,600	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	0.5	4
<i>C. tropicalis</i> 1150	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	0.25	>64
<i>C. tropicalis</i> 933	1,600	3,200	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	0.125	4
<i>C. tropicalis</i> 916	1,600	3,200	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	0.125	4
<i>Cryptococcus neoformans</i> 5811	800	1,600	1,600	100	200	800	1,600	800	0.25	0.5
<i>C. neoformans</i> 5980	800	1,600	1,600	100	200	800	1,600	800	0.25	0.5

^a The MFC value was defined as the lowest concentration of the antifungal agent. MIC values were read after two days at 37 °C. The inoculum sizes contained approximately 2.5 x 10³ cells/mL. Culture media tested were the RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). The final concentration of thiophenes derivates was between 6.25-3,200 µg/mL, 0.06-16 µg/mL for amphotericin B and 0.125-64 µg/mL for fluconazole.

^b Amphotericin B

^c Fluconazole

^d *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used as reference strain.

The compounds **3a-g** were not listed in the table 2, since they did not presented any antifungal activity against all testes fungi until the highest concentration tested (3,200 µg/mL).

Data reported in Table 2 show that cycloalkyl derivatives **4a-h** were active against nearly all fungi tested to some extent. They presented moderate or poor anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* activity. However, **4a-h** inhibited more significantly the growth of *Cryptococcus neoformans* than the *Candida* strains. It was also noted that, these active compounds showed fungicidal and not fungistatic effect against all yeasts tested.⁴⁸

The cyclopentyl **4a-c** and cycloheptyl **4g,h** derivatives presented similar profile of antifungal activity with MFC values in the range of 1,600-3,200 µg/mL for *Candida* and 800-1,600 µg/mL for *Cryptococcus* and they were, in general, 2 to 8 times less active than the cyclohexyl derivatives **4d-f**. The 4-NO₂ derivative **4d** exhibited the greatest activity, with MFC values from 2 to 8 times lower than the others cyclohexyl derivatives **4e,f**. It presented MFC values at 100 µg/mL and 200 µg/mL in several cases (Table 3, rows 1, 2, 3, 20, 23, 26, 27, 43 and 44) while the amphotericin B and fluconazole had values of 0.25 µg/mL and 16 µg/mL respectively.

In terms of structure-activity relationships (SAR), the positions 4 and 5 of the thiophene ring seemed to have big influence on the antifungal activity. Substitution of 5-methyl (**3a-g**) (inactive compounds) for 4,5-cycloalkyl radicals (**4a-h**) make active compounds and is essential for the antifungal activity. For the cycloheptyl derivatives **4g,h** the withdrawing group *para*-chlorophenyl of **4h** increase 2 times de activity (in half of cases). In contrast, for the cyclopentyl serie **4a-c** it was not observed, and the compounds **4b** and **4c** with *para*-bromophenyl and *para*-chlorophenyl substituents respectively, exhibited lower activity that the derivative not substituted **4a**. The most active compounds **4d-f** were those with polymethylene bridge $[-(\text{CH}_2)_4-]$. For these cyclohexyl derivatives, **4d** with the nitro group linked to the 4-position of the phenyl group, exhibited the best profile, followed by **4e** (*para*-bromophenyl) (2 times more active than **4f** (4-Cl) in a quarter of cases, and 4 times more active for the *Cryptococcus* strains).

In addition to the antifungal evaluation, all synthesized compounds were evaluated regarding their cytotoxic activities against BALB/c mice spleen cells line in the assay of incorporation of 3H-thymidine.⁴⁹ The assay measures the ³H-thymidine incorporation in the cells exposed to the tested compound and assessing the activity of each compound on the ability to inhibit the synthesis of DNA.⁵⁰ In this cytotoxic evaluation was found that all the tested compounds present no cytotoxic effects in level doses less that 1µg/mL.

In conclusion, a series of novel 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives **3a-g** and **4a-h** were synthesized in good yields (80 - 99%) and were assessed for their *in vitro* antifungal activities on 42 *Candida* and 2 *Cryptococcus neoformans* strains. The compounds presented, in general, moderate or poor *in vitro* antifungal activity but with fungicidal activity. The strains of *Cryptococcus* were more sensitive than those of the genus *Candida* to new thiophene derivatives. It was found that the presence of 4,5-cycloalkyl groups (compounds **4a-h**) linked to the thiophene moiety is essential for the antifungal activity, and the mono-methylation at the 5-position results in inactive compounds (**3a-g**). Among them, cyclohexyl derivatives **4d-f** exhibited the best profile of antifungal activity. And the compound **4d** was the most active among them, with MFC values included in the range of 100-1,600 µg/mL. Modifications to improve the potency of these derivatives by diversification of the benzylidene moiety are currently under progress in our laboratory. Results suggest that these thiophene derivatives, especially cyclohexyl derivatives **4d-f**, would be potential antifungal agents, especially anti-*Cryptococcus* agents, and may be considered promising compounds for the development of news antimycotic agents.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), UEPB, through the Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa/PRPGP and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). Authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for Reginaldo G. Lima-Neto, Ph.D. scholarship. We thank the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and the Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF).

References and notes

1. Kontoyannis, D.; Mantadakis, E.; Samonis, G. *J. Hosp. Infect.* **2003**, *53*, 243.
2. Garber, G. *Drugs* **2001**, *61*, 1.
3. Brown, J.M. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2004**, *17*, 34.
4. Walsh, T.J.; Groll, A.H. *Transpl. Infect. Dis.* **1999**, *1*, 247.
5. Ampel, N.M. *Emerg. Infect. Dis.* **1996**, *2*, 109.
6. Goker, H.; Kus, C.; Boykin, D. W.; Yildiz, S.; Altanlar, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2589.
7. Rybak, M. J.; Akins, R. L. *Drugs* **2001**, *6*, 11.
8. Moudgal, V.; Little, T.; Bolkov, D.; Vazquez, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 767.
9. Hernandez, S.; Lopez-Ribot, J. L.; Najvar, L. K.; McCarthy, D. I.; Bocanegra, R.; Graybill, J. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1382.
10. Krogh-Madsen, M.; Arendrup, M. C.; Heslet, L.; Knudsen, J. D. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 938.
11. He, Y.; Wu, B.; Yang, J.; Robinson, D.; Risen, L.; Ranken, R.; Blyh, L.; Sheng, S.; Swayze, E. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3253.
12. Dupont, B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 31.
13. Baddley, J. W.; Moser, S. A. *Clin. Lab. Med.* **2004**, *24*, 721.
14. Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 501.
15. Perfect, J. R. *Oncology (Williston Park)* **2004**, *18*, 15.
16. Krcmery Jr., V. C. *Med. Princ. Pract.* **2005**, *14*, 125.
17. Fanos, V.; Cataldi, L.; *J. Chemother.* **2000**, *12*, 463.
18. Sheehan, D. J.; Hitchcock, C. A.; Sibley, C. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 40.
19. Fostel, J. M.; Lartey, P. A. *Drug Discov Today* **2000**, *5*, 25.
20. Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; Werbovetz, K. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 797.
21. Gonzalez, J. L.; Stephens, C. E.; Wenzler, T.; Brun, R.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Barszcz, T.; Werbovetz, K. A.; Boykin, D. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 552.
22. Sharma, S.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1414.
23. Rando, D. G.; Doriguetto, A. C.; da Silva C. H. T. P.; Ellena, J.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Varanda, E. A.; Ferreira, E. I. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1196.
24. Fakhr, I. M. I.; Radwan, M. A. A.; El-Batran, S.; El-Salam O. M. E. A.; El-Shenawy, S. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *44*, 1718.
25. Meng, Q.; Slassi, A. Rakhit, S. U.S. Patent 5,770,742, **1998**.
26. Talley, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Collins, P. W.; Penning, T. D.; Reitz, D. B.; Rogers, R. S. U.S. Patent 7,030,153 B2, **2006**.
27. Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Pavani, M. G.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Fruttarolo, F.; Piccagli, L.; Jung, M. K.; Hamel, E.; Borgatti, M.; Gambari, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3906.

28. Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Carrion, M. D.; Cara, C. L.; Cruz-Lopez, O.; Preti, D.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Zonta, N.; Balzarini, J.; Brancale, A.; Sarkare, T.; Hamele, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5367.
29. Price, S.; Bordogna, W.; Bull, R. J.; Clark, D. E.; Crackett, P. H.; Dyke, H. J.; Gill, M.; Harris, N. V.; Gorski, J.; Lloyd, J.; Lockey, P. M.; Mullett, J.; Roach, A. G.; Roussel, F.; White, A. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 370.
30. Nair, M. G.; Abraham, A. U.S. Patent 5,260,296, **1993**.
31. Kim, S. H.; Tran, M. T.; Ruebsam, F.; Xiang, A. X.; Ayida, B.; McGuire, H.; Ellis, D.; Blazel, J.; Tran, C. V.; Murphy, D. E.; Webber, S. E.; Zhou, Y.; Shah, A. M.; Tsan, M.; Showalter, R. E.; Patel, R.; Gobbi, A.; LeBrun, L. A.; Bartkowski, D. M.; Nolan, T. G.; Norris, D. A.; Sergeeva, M. V.; Kirkovsky, L.; Zhao, Q.; Han, Q.; Kissinger, C. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4181.
32. Bonini, C.; Chiummiento, L.; De Bonis, M.; Funicello, M.; Lupattelli, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2797.
33. Pinto, E.; Queiroz, M.-J. R. P.; Vale-Silva, L. A.; Oliveira, J. F.; Begouin, A.; Begouin, J.-M.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8172.
34. Fokialakis, N.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O.; Skaltsounis, A. L.; Wedge, D. E. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1651.
35. Chobot, V.; Buchta, V.; Jahodářová, H.; Pour, M.; Opletal, L.; Jahodář, L.; Harant, P. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 288.
36. Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Estevinho, L. M.; Queiroz, M.-J. R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5831.
37. Ryu, C.-K.; Lee, S.-K.; Han, J.-Y.; Jung, O.-J.; Lee, J. Y.; Jeong, S. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2617.
38. Gewald, K. *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 3571.
39. Sridhar, M.; Rao, R. M.; Baba, N. H. K.; Kumbhare, R.M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3171.
40. *Representative procedure for (3a-g).* 2-[(2-Nitro-benzylidene)-amino]-5-methyl-thiophene-3-carbonitrile (**3a**). Reaction mixture containing equimolar amounts of **1** (3,30 mmol) and 2-nitro-benzaldehyde (3,30 mmol) in ethanol 5 mL and 5 drops of acetic acid were stirred under reflux for 2 h and then cooled to room temperature. Water (50mL) was added and the solid which precipitated out was filtered under vacuum filtration, washed with water, and dried in desiccator to give **3a**. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 2.46 (3H, d, J = 1.2 Hz, CH₃), 7.18 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-4), 7.82 (1H, dt, J = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H), 7.92 (1H, dt, J = 7.8, 1.5 Hz, Ar-H), 8.15 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H), 8.20 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H), 8.93 (1H, s, CH=N); Anal. for C₁₃H₉N₃O₂S. Calcd (%): C, 57.55; H, 3.34; N, 15.49; S, 11.84. Found (%): C, 57.58; H, 3.55; N, 15.40; S, 11.68.
41. *Typical procedure: the preparation of 2-[(4-Chloro-benzylidene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4H-benzof[b]thiophene-3-carbonitrile (4f)* Reaction mixture containing equimolar amounts of **2b** (3,30 mmol) and 4-chloro-benzaldehyde (3,30 mmol) in ethanol 10 mL and 5 drops of acetic acid were stirred under reflux for 1.5 h and then cooled to room temperature. Water (50mL) was added and the solid which precipitated out was filtered under vacuum filtration, washed with water, and dried in desiccator to give **4f**. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 1.84 (m, 4H, CH₂), 2.66 (m, 4H, CH₂), 7.41 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.84 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar), 8.33 (s, 1H, CH=N). Anal for C₁₆H₁₃ClN₂S. Calcd (%): C, 63.98; H, 4.36; N, 9.33; S, 10.65. Found (%): C, 64.08; H, 4.39; N, 9.32; S, 10.48.
42. *Experimental:* Solvents and reagents were purchased from Sigma-Aldrich and were purified in the usual manner. Compounds **1** and **2a-c** were prepared according to known literature procedures.^{38,39} All reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel precoated GF₂₅₄ E. Merck plates. Melting points were determined on a Büchi-535 apparatus and are uncorrected. The microanalysis was performed on an elemental analyzer Carlo Erba EA1110. Beta-radiation counter (β-matrix 9600, Packard). NMR spectra were recorded with a Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer by using tetramethylsilane as internal standard. Chemical shifts are reported in ppm (δ) and coupling

constants (J) are reported in hertz. Signals are designated as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublets of doublets; m, multiplet; b, broad

43. CLSI, CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-second edition M27-A2. Wayne, PA, **2002**.
44. NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Method M27-A2, 2nd ed., Wayne Ed.; **2002**, 22, 1.
45. *Antifungal activity*: The *in vitro* antifungal activity of the compounds was determined with the broth microdilution method according to the reference method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁴⁴. All the strains have been streaked in mineral oil at 18°C. Viability test and subsequent taxonomic confirmation were carried out according to BARNETT et al.⁴⁷ and HOOG et al.⁴⁸ In order to obtain an inoculum 2.5×10^3 cells/mL, each strain was cultured on a tube containing 20 mL of Sabouraud Dextrose Agar plus yeast extract at 35 °C for two days. After this time suspensions were prepared in sterile physiological solution (0.85%) and mixed in a rotator shaker. The inoculum was adjusted to 90% transmittance at 530 nm, measured in a spectrophotometer. Stock solutions of tested compounds were freshly prepared and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), in aliquoted, and stored at -20°C in stock solution in final concentration at 3,200 µg/mL. Decimal dilutions of thiophenes stock solution were prepared in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO) and buffered to pH 7.0 with 0.165 M of morpholinopropanesulphonic acid (MOPS, Sigma). Microdilution plates containing serial dilutions of each compound were inoculated with each organism; each plate included positive controls (fungi without a compound) and a negative control (medium only). The microdilution plates were incubated at 35 °C and were read visually after 24 and 48h of incubation. All tests were performed in triplicate. The MFC for all strain was defined at the lowest concentration of antifungal agent that completely inhibited growth of the organism, as detected by the unaided eye.
46. Barnett, J. A.; Paire, R. W.; Yarrow, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press, **2000**.
47. Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, **2000**.
48. *Fungicidal activity*: Wells that had inhibited the fungal growth (in the test of antifungal activity), its contents were collected and re-plated (in plates of Sabouraud Dextrose Agar), where we have seen that in neither case was re-acquired the original fungal cultures.
49. *In vitro cytotoxicity*: The cytotoxicity of the newly synthesized compounds was tested against spleen cells of isogenic BALB/c mice. The viability of cells exposed to test compounds was determined by the Trypan Blue dye exclusion assay.⁵⁰ Was prepared one suspension in complete growth medium (Dubelcco's modified Eagle's culture medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FCS, Cultilab, Brazil) and 50 µg/mL of gentamycin (Novafarma, Brazil) to give a total cell count of 5×10^6 cells/well. For the determination of the non-cytotoxic concentration, stock solutions of the tested compounds **3a-g** and **4a-h** were prepared in sterile dimethylsulfoxide (DMSO), and each compound were evaluated in five different concentrations (100, 50, 25, 10 and 1 µg/ml) in triplicate. Wells containing: only spleen cells in culture medium, cells with saponin (0.05%) (product with know cytotoxic activity) and cells with DMSO (1%) all of them with ³H-thymidine (1 µCi/well) were used in each plates as control. Cultures were incubated in the presence of ³H-thymidine (1 µCi/well) for 24 h in 5% CO₂ at 37 °C. After this period, the content of the plate was harvested to determine ³H-thymidine incorporation using a beta-radiation counter (β-matrix 9600, Packard). The cytotoxicity of the compound was determined by comparing the percentage of ³H-thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) of drugs-treated wells in relation to untreated wells. Non cytotoxic concentrations were defined as those that caused a reduction of ³H-thymidine incorporation below 30% in the untreated cell (control).
50. Freshner, R. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*; Alan R. Liss, Inc.: New York, **1987**; p 117.

Synthesis and antifungal effect in vitro of triazoles on *Candida* strains

Reginaldo G. Lima-Neto^{a,*}; Janaína V. dos Anjos^b; Rajendra M. Srivastava^b; Francisco J. B. Mendonça Junior^c; Rejane P. Neves^a

^a Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil.

^b Departamento de Química Fundamental, UFPE, Recife, Brazil.

^c Laboratório de Síntese e Vetorização de substâncias Bioativas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa 58020-540, Brazil

*Corresponding author: Janaína Versiani dos Anjos
Tel: + 55 81 2126 7411 Fax: + 55 81 2126 8480
E-mail: janaversiani@hotmail.com

Abstract

1,2,3-Triazoles have been extensively studied as compounds having important biological activities. In this work, we describe the synthesis of ten 2-[1-aryl-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ols via copper catalyzed azide alkyne cycloaddition ((Cu(OAc)₂ ou “click chemistry”). These ten triazole derivatives had their *in vitro* antifungal activity evaluated using the microdilution broth method against 42 isolates of four different *Candida* species. Among all tested drugs, the halogen substituted triazole, 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol, showed the best antifungal profile, can be used therapy in future for fungal infections.

Keywords: *Candida* spp., antifungal activity, triazoles, halogen.

1 Introduction

Deep and superficial fungal infections have increased significantly over the past few decades. Control of fungal disease has proved to be difficult because of the several risk factors. The number of patients at highest risk for these infections has been steadily increasing especially in immunocompromised patients due to AIDS, organ transplantation, chemotherapy or other invasive procedures [1]. There is a clear need for development of effective antimycotic therapeutic agents for the treatment of fungal infections, since the major classes of antifungal drugs available have encountered resistance in clinical use [2,3]. Among these classes, azoles are the most used because of their broad spectrum, high potency and low toxicity [4].

Azoles are competitive inhibitors of the lanosterol 14 α -demethylase (a cytochrome P-450 enzyme), leading to a decrease in the fungal biosynthesis of ergosterol, which is a key compound of fungal cell membrane, thereby preventing fungal growth [5]. Beyond the antifungal properties [6,7,8], triazole compounds also possess a variety of interesting biological activities such as antibacterial and antituberculosis [9,10,11,12,13,14,15], anticancer [16,17] and analgesic [18].

Considering the above mentioned advantages of triazole-containing antifungal drugs and the increasing drug resistance mechanisms in these type of microorganisms, we decided to synthesize 2-[1-aryl-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ols capable of inhibiting cell growth of some *Candida* species with clinical relevance, using the microdilution broth method.

2 Experimental Protocols

2.1 Synthesis

All commercially available reagents were used without any further purification and the reactions were monitored by TLC analysis (TLC plates GF₂₅₄ E. Merck). Melting points were determined on a Büchi apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed on Silica Gel 60 (70-230 mesh, E. Merck). NMR spectra were recorded with a Bruker AC-200 MHz spectrometer and referenced as following: ¹H (200 MHz), internal SiMe₄ at δ = 0.00 ppm, ¹³C (50 MHz), internal standard at δ = 77.23 ppm. Exact mass measurements of the molecular ions were obtained on a Shimadzu LC/MS-IT-TOF Elettrospray.

Synthesis of the aromatic azides (2a-j). To a solution of the corresponding aniline (**1a-j**, 4,1 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (30 mL), was added 30 mL HCl 6N, at 0°C. To this biphasic system was added dropwise a saturated aqueous solution of NaNO₂ (10 mL). After stirring for 30 min at 0°C, NaN₃ (0,53g, 8.2 mmol) was added at 0°C. Stirring was pursued for 30 min, and the mixture was allowed to warm to room temperature. The two phases were separated, and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 50mL). The combined organic layers were washed with aqueous solution of NaHCO₃, then brine, dried (Na₂SO₄) and filtered under active charcoal. Evaporation of the solvent *in vacuo* gave the crude azide (**2a-j**) that was used in the next step without further purification.

Synthesis of 2-[1-aryl-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ols (4a-j). 2-Methyl-but-3-yn-2-ol (**3**, 1,1 mmol) and the azido compound (**2a-j**, 1 mmol) were suspended in 1:1 mixture of CH₂Cl₂ and water (10 mL). To this solution was added a mixture of Cu(OAc)₂ (36 mg, 0.2 mmol) and sodium ascorbate (79 mg, 0.4 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature until TLC analysis indicated complete consumption of the azide. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and water (5 mL). The organic layer was separated, and the water phase was extracted again with CH₂Cl₂ (5 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄. Removal of the solvent *in vacuo* gave a residue that was recrystallized from chloroform:hexanes to afford the corresponding triazole (**4a-j**).

2-[1-Phenyl-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4a): white crystals; yield 86%; m.p.: 95-96°C; *R*_f 0,60 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.97 (s, 6H, 2 CH₃); 2.92 (bs, 1H, OH); 6.73 (m, 3H, H_{arom}); 6.93 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, 2 Hz, H_{arom}); 6.97 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, 2 Hz, H_{arom}); 7.24 (s, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 30.3; 68.5; 117.7; 120.4; 128.5; 129.6; 136.9; 156.4. ESI-HRMS Calcd for C₁₁H₁₃N₃ONa [M + Na]⁺: 226.0956. Found: 226.0911.

2-[1-(4-Tolyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4b): white crystals; yield 78%; m.p.: 120-121°C; *R*_f 0,65 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.99 (s, 6H, 2 CH₃); 1.68 (s, 3H, CH_{3arom}); 3.13 (bs, 1H, OH); 6.54 (bd, 2H, *J* = 8.0 Hz, H_{arom}); 6.85 (bd, 2H, *J* = 8.0 Hz, H_{arom}); 7.24 (s, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 20.9; 30.4; 68.4; 117.7; 120.2; 130.0; 134.6; 138.5; 156.2. ESI-HRMS Calcd for C₁₂H₁₄N₃O [M - H]⁺: 216.2591. Found: 216.7793

2-[1-(4-Chlorophenyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4c): white crystals; yield 67%; m.p.: 93-94°C; *R*_f 0,67 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ

0.98 (s, 6H, 2 CH₃); 2.90 (bs, 1H, OH); 6.75 (dd, 2H, $J = 8.0$ Hz, 2 Hz, H_{arom}); 6.93 (dd, 2H, $J = 8.0$ Hz, 2.0 Hz, H_{arom}); 7.24 (s, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 30.3; 68.5; 107.1; 117.6; 121.5; 129.7; 134.2; 135.4; 156.6. ESI–HRMS Calcd for C₁₁H₁₂ClN₃ONa [M + Na]⁺: 260.0567. Found: 260.0518.

2-[1-(4-Bromophenyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4d): white crystals; yield 96%; m.p.: 95-96°C; R_f 0,68 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.70 (s, 6H, 2 CH₃); 3.68 (bs, 1H, OH); 7.59 (m, 4H, H_{arom}); 7.97 (s, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 30.3; 68.4; 107.0; 121.7; 122.1; 132.7; 135.8; 156.7. ESI–HRMS Calcd for C₁₁H₁₂BrN₃ONa [M + Na]⁺: 305.1263. Found: 305.9989.

2-[1-(4-Methoxyphenyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4e): red crystals; yield 69%; m.p.: 106-107°C; R_f 0,65 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.67 (s, 6H, 2 CH₃); 3.00 (bs, 1H, OH); 3.82 (s, 3H, OCH₃); 6.96 (dd, 2H, $J = 6.0$ Hz, 4.0 Hz, H_{arom}); 7.57 (dd, 2H, $J = 6.0$ Hz, 4.0 Hz, H_{arom}); 7.81 (s, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 30.4; 55.5; 68.5; 114.6; 122.1; 130.5; 159.6. ESI–HRMS Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₂Na [M + Na]⁺: 256.2562. Found: 256.1010.

2-[1-(3-Nitrophenyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4f): white crystals; yield 75%; m.p.: 98-100°C; R_f 0,60 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.63 (s, 6H, 2 CH₃); 3.96 (bs, 1H, OH); 7.65 (bd, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{arom}); 8.12 (m, 2H, H_{arom}); 8.16 (s, 1H, H_{triazole}); 7.65 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H_{arom}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 30.2; 68.4; 114.9; 122.9; 125.8; 130.8; 137.5; 148.6; 157.1. ESI–HRMS Calcd for C₁₁H₁₂N₄O₃Na [M + Na]⁺: 271.2278. Found: 271.0764.

2-[1-(4-Nitrophenyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4g): yellow crystals; yield 58%; m.p.: 123-124°C; R_f 0,63 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.69 (s, 6H, 2 CH₃); 2.82 (bs, 1H, OH); 7.95 (dd, 2H, $J = 6.0$ Hz, 4.0 Hz, H_{arom}); 8.03 (s, 1H, H_{triazole}); 8.37 (dd, 2H, $J = 6.0$ Hz, 2.0 Hz, H_{arom}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 30.4; 68.7; 107.1; 120.3; 125.5; 141.2; 147.0; 157.2. ESI–HRMS Calcd for C₁₁H₁₃N₄O₄ [M + H₂O - H]⁺: 265.2453. Found: 265.1469.

2-[1-(3,4-Dimethylphenyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4h): yellow crystals; yield 31%; m.p.: 128-129°C; R_f 0,80 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.00 (s, 6H, 2 CH_{3arom}); 1.60 (s, 6H, 2 CH₃); 2.69 (bs, 1H, OH); 6.53 (m, 1H, H_{arom}); 6.72 (dd, 2H, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, H_{arom}); 7.19 (s, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 19.3; 19.8; 30.4; 68.5; 107.1; 117.7; 121.5; 130.4; 134.9; 137.2; 138.1; 156.0. ESI–HRMS Calcd for C₁₃H₁₇N₃ONa [M + Na]⁺: 254.2833. Found: 254.1229.

2-[1-(α -Naphthyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (4i): red crystals; yield 62%; m.p.: 152-153°C; R_f 0,65 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.75 (s, 6H, 2 CH_3); 3.00 (sl, 1H, OH); 7.54 (m, 5H, H_{arom}); 7.82 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$); 7.95 (m, 3H, H_{arom}). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 30.5; 68.6; 122.3; 123.5; 127.0; 128.2; 128.5; 130.3; 133.7; 134.0; 155.5. ESI–HRMS Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 276.2889. Found: 276.1070.

2-[1-(β -Naftil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]-propan-2-ol (4j): yellow crystals; yield 60%; m.p.: 143-144°C; R_f 0,68 (ethyl acetate:chloroform 9:1, v/v). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.72 (s, 6H, 2 CH_3); 2.97 (bs, 1H, OH); 7.53 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{arom}); 7.89 (m, 4H, H_{arom}); 8.03 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$); 8.12 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H_{arom}). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 30.4; 68.6; 118.3; 118.9; 126.9; 127.3; 127.8; 128.2; 129.9; 132.7; 133.1; 134.4; 155.6. ESI–HRMS Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 276.2889. Found: 276.1071.

2.2 Strains and growth cultures

Twenty strains of *Candida albicans*, five of *Candida krusei*, eleven of *Candida parapsilosis* and five of *Candida tropicalis* were supplied by the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Biological Sciences Centre of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. Strains have been stocked in mineral oil at 18 °C [19]. Viability tests and subsequent taxonomic confirmation of their morphological, biochemical and physiological characteristics were carried out [20]. Species, accession numbers, stock time and isolation substratum are summarised in Table 1.

2.3 In vitro antifungal susceptibility

Reference microdilution trays, containing serial drug dilutions were prepared by following the CLSI M27-A3 guidelines [21]. The triazoles were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and then these stock solutions were stored at -80°C. The concentrations tested ranged from 2 to 2,048 $\mu\text{g/mL}$. Fluconazole was used as reference drug at concentrations from 0.125 to 64 $\mu\text{g/mL}$.

In order to obtain a fungal inoculum containing $1\text{--}5 \times 10^6$ CFU/mL, each strain was cultured on a tube containing 20 mL of Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco) plus yeast extract at 35 °C for two days. After this time, yeast suspensions were prepared in sterile physiological solution (0.85%) and maintained at 28 ± 2 °C and then were adjusted

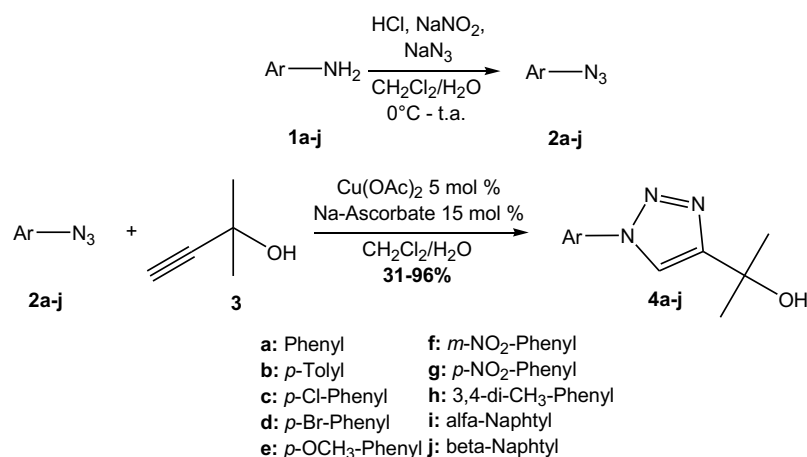
to 90% transmittance at 530 nm. Two serial dilutions from 1:100 and 1:20 sequentially were made to obtain a final inoculum containing 1.0×10^3 and 5×10^3 CFU/mL.

The microdilution wells containing 100 μ L of the twofold serial dilutions of the test and reference drugs in standard RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO), buffered to pH 7.0 with 0.165 M of morpholinopropanesulphonic acid (MOPS, Sigma), were inoculated with 100 μ L of inoculum. After inoculation, the microplates were incubated at 35 °C in a non-CO₂ incubator and were read visually 48h after the incubation. MICs corresponded to the lowest drug dilution that showed growth inhibition compared to untreated yeasts. *C. parapsilosis* ATCC 22019 was used as reference strain. All tests were performed in triplicate.

3 Results

3.1 Chemistry

Prior to the synthesis of the 2-[1-aryl-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ols, the aromatic azides (**2a-j**) were prepared from the corresponding anilines (**1a-j**) following the Malolanarasimhan conditions [22]. The aromatic azides were then reacted with 2-methyl-but-3-yn-2-ol (**3**) using Cu(OAc)₂ and sodium ascorbate as catalyst in 1:1 dichloromethane:water to give the products **4a-j** in good yields (Scheme) [23,24].



Scheme

For all synthesized molecules, only one regioisomer could be detected by ¹H NMR. Only one singlet was observed in the ¹H NMR spectra for the triazole ring (δ 7.19 – 8.16 ppm), which can be attributed to the proton in the C-5 position of the triazole nucleus. This way, according to earlier literature for the copper catalyzed cycloadditions [25,26], it is believed that the obtained products are 1,4-regioisomers.

3.2 Biology

For each experiment, the inoculum controls produced clearly detectable growth after the chosen incubation period, indicating that all isolates were viable and that the conditions used were suitable for fungal growth.

The antifungal screening results by MIC measured are summarized in Table 2. Most of the synthesized 1,2,3-triazoles showed weak (**4a,b,d,e,f**) or no (**4g,h,i,j**) activity against the *Candida* species used herein. However, for 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (**4c**) and for the reference drug (fluconazole), it could be possible to determine a MIC for *Candida* growth. As it can be seen, fluconazole showed fungistatic activity in concentrations ranging from 0.5 to 64 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Eight isolates (4987, 4986, 4984, 4970, 4790, 4608, 1059 and 109) had their growth inhibited in a dose-dependent pattern, presenting MIC values ranging from 16 to 32 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. In contrast to these findings, nine isolates (4990, 4802, 4388, 4263, 4261, 4124, 3719, 1150 and 934) were resistant to the reference azole showing MIC values above 64 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. It can be also observed that the triazole **4c** showed good antifungal activity, presenting MIC values ranging from 64 to 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against all the tested strains.

Observing the drug structure, it can be noticed that this compound possesses a chlorine atom substituted in the *para* position of the phenyl ring present at the N-1 position of the triazole nucleus. Chlorine substituted rings were found to be good antifungal tools, as reported by Wang and colleagues [27]. In their study, sixteen *N*-methyl-substituted phenoxybutan-1-amine chlorine substituted derivatives exhibited strong *in vitro* antifungal activity, being more active against the tested microorganisms than the used reference drug, voriconazole. Later, Wang et al. [28] decided to synthesize fourteen novel triazoles substituted with a phenoxyalkyl group. They also observed that the best antifungal drugs were those with halogen atoms as the substituents in the phenyl rings.

4 Conclusion

In conclusion, a series of analogs of 1,2,3-triazoles with ten distinct substituents at the N-1 of the triazole ring were synthesized and assessed for their antifungal activity. All compounds were tested against 42 pathogenic strains of four different *Candida* species. Modification of substituents has a great impact in the minimal inhibitory

concentration values since we could obtain triazole derivatives showing no antimycotic activity, with moderate antifungal activity and only one compound with good activity. The antifungal tests data show that the chlorine substituted triazole derivative exhibited, in particular, good fungal growth inhibition, showing that further modifications in the 2-[1-(aryl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl] series can be done in order to obtain more potent prototypes.

References

- [1] R. Lopez-Martinez, Clin. Dermatol. 28 (2010) 178–184.
- [2] A. Chen, J.D. Sobel, Expert. Opin. Emerg. Drugs. 10 (2005) 21–33.
- [3] M.J. Rybak, R.L. Akins, Drugs 6 (2001) 11.
- [4] D.J. Sheehan, C.A. Hitchcock, C.M. Sibley, Clin. Microbiol. Rev. 12 (1999) 40–79.
- [5] Q.L. Wei, S.S. Zhang, J. Gao, W.H. Li, L.Z. Xu, Z.G. Yu, Biol. Med. Chem. 14 (2006) 7146–7153.
- [6] H.L. Hoffman, E.J. Ernst, M.E. Klepser, Expert. Opin. Invest. Drugs 9 (2000) 593–605.
- [7] N. Ulusoy, A. Gursoy, G. Otuk, Farmaco 56 (2001) 947–952.
- [8] N. Demirbas, A. Demirbas, S.A. Karaoglu, Bioorg. Khim. 31(2005) 430–440.
- [9] G.B. Bagihalli, P.G. Avaji, S.A. Patil, P.S. Badami, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 2639–2649.
- [10] M.S. Karthikeyan, D.J. Prasad, B. Poojary, K.S. Bhat, B.S. Holla, N.S. Kumari, Bioorg. Med. Chem. 14 (2006) 7482–7489.
- [11] K. Dabak, O. Sezer, A. Akar, O. Anac, Eur. J. Med. Chem. 38 (2003) 215–218.
- [12] W. Monika, M. Swatko-Ossor, L. Mazur, Z. Rzaczyńska, A. Siwek, J. Heterocyclic Chem. 45 (2008) 1893–1896.
- [13] S. Joshi, N. Khosla, P. Tiwari, Bioorg. Med. Chem. 12 (2004) 571–576.
- [14] I. Küçükgülzel, S.G. Küçükgülzel, S. Rollas, M. Kirazlı, Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 (2001) 1703–1707.
- [15] V. Klimesova, L. Zahajska, K. Waisser, J. Kaustova, U. Mollmann, Farmaco 59 (2004) 279–288.
- [16] S. Danoun, G. Baziard-Mouysset, J. Stigliani, M. Payard, M. Selkti, B. Viossat, A. Tomas, Heterocyclic Commun. 4 (1998) 45–51.

- [17] B.S. Holla, B. Veerendra, M.K. Shivanada, B. Poojary, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 759–767.
- [18] G. Turan-Zitouni, Z.A. Kaplancikli, K. Erol, F.S. Kilic, *Farmaco* 54 (1999) 218–223.
- [19] A.F. Sherf, *Phytopathology* 31 (1943) 30–32.
- [20] G.S. Hoog, J. Guarro, J. Gene, M.J. Figueras, *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Utrecht, Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- [21] CLSI. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- [22] Malolanarasimhan, K.; Lai, C. C.; Kelley, J. A.; Iaccarino, L.; Reynolds, D.; Young, H. A.; Marquez, V. E. *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 2717-2722.
- [23] Lee, B.Y.; Park, S. R.; Jeon, H. B.; Kim, K. S. *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 5105–5109.
- [24] dos Anjos, J.V.; Sinou, D.; de Melo, S.J.; Srivastava, R.M. *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 2440-2449.
- [25] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, H.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 210-216.
- [26] dos Anjos, J. V.; Neves Filho, R. A. W. ; Nascimento, S.C. ; Srivastava, R. M.; Melo, S. J. ; Sinou, D. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3571-3576.
- [27] W. Wang, C. Sheng, X. Che, H. Ji, Y. Cao, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5965–5969.
- [28] W. Wang, S. Wang, Y. Liu, G. Dong, Y. Cao, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, C. Sheng, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 6020–6026.

Table 1. *Candida* strains studied.

Species	Accession n° (URM)	Storage (years)	Substratum
<i>C. albicans</i>	4990	01	Vaginal secretion
<i>C. albicans</i>	4987	01	Vaginal secretion
<i>C. albicans</i>	4986	01	Vaginal secretion
<i>C. albicans</i>	4820	02	Ungual scrap
<i>C. albicans</i>	4819	02	Ungual scrap
<i>C. albicans</i>	4817	02	Ungual scrap
<i>C. albicans</i>	4609	03	Blood
<i>C. albicans</i>	4606	03	Blood
<i>C. albicans</i>	4388	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	4387	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	4386	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	4385	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	4384	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	4260	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	4127	07	Inguinal area
<i>C. albicans</i>	4126	07	Urine
<i>C. albicans</i>	4125	07	Spittle
<i>C. albicans</i>	4124	07	Oropharyngeal secretion
<i>C. albicans</i>	3719	10	Tooth scrap
<i>C. albicans</i>	3716	10	Tooth scrap
<i>C. krusei</i>	4802	02	*
<i>C. krusei</i>	4263	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. krusei</i>	1059	48	*
<i>C. krusei</i>	934	49	Appendix biopsy
<i>C. krusei</i>	109	52	*
<i>C. parapsilosis</i>	4984	01	Vaginal secretion
<i>C. parapsilosis</i>	4970	01	Vaginal secretion
<i>C. parapsilosis</i>	4889	02	Blood
<i>C. parapsilosis</i>	4818	02	Ungual scrap
<i>C. parapsilosis</i>	4804	02	IFM
<i>C. parapsilosis</i>	4608	03	Blood
<i>C. parapsilosis</i>	4607	03	Blood
<i>C. parapsilosis</i>	4261	05	Oropharyngeal secretion
<i>C. parapsilosis</i>	3627	12	Spittle
<i>C. parapsilosis</i>	3624	12	Spittle
<i>C. parapsilosis</i>	3621	12	Spittle
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC22019	-	-
<i>C. tropicalis</i>	4790	02	Cassava powdery
<i>C. tropicalis</i>	4262	06	Oropharyngeal secretion
<i>C. tropicalis</i>	1150	46	Tongue
<i>C. tropicalis</i>	933	49	Vaginal secretion
<i>C. tropicalis</i>	916	49	Feces

*Substratum no identified

Table 2. Antifungal activity of triazoles **4a-j** and fluconazole against *Candida* strains studied.

Tested strain n° URM	Compounds (MICs in µg/mL) ^a										Flu ^b
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4i	4j	
4990	2,048	1,024	256	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	>64
4987	2,048	1,024	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	16
4986	2,048	1,024	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	16
4820	2,048	1,024	256	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	4
4819	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	4
4817	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	4
4609	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	4
4606	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	2
4388	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	>64
4387	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	2
4386	2,048	1,024	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	1
4385	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	2
4384	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	2
4260	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	2
4127	R	1,024	128	1,024	2,048	2,048	R	R	R	R	0.5
4126	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	0.5
4125	2,048	1,024	256	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	0.5
4124	2,048	1,024	256	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	>64
3719	R	1,024	256	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	64
3716	R	1,024	256	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	0.5
4802	2,048	2,048	256	2,048	1,024	R	R	R	R	R	64
4263	2,048	2,048	256	2,048	1,024	R	R	R	R	R	64
1059	2,048	1,024	64	512	1,024	2,048	R	R	R	R	16
934	2,048	2,048	256	2,048	1,024	R	R	R	R	R	64
109	2,048	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	16
4984	R	2,048	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	16
4970	R	2,048	128	1,024	512	2,048	R	R	R	R	16
4889	R	1,024	64	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	2
4818	R	2,048	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	4
4804	R	2,048	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	8
4608	R	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	16
4607	R	1,024	128	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	4
4261	R	2,048	256	1,024	1,024	R	R	R	R	R	>64
3627	2,048	1,024	64	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	0.5
3624	2,048	1,024	64	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	0.5
3621	2,048	1,024	64	1,024	1,024	2,048	R	R	R	R	0.5
22019 ^c	R	2,048	256	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	8
4790	R	2,048	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	32
4262	R	1,024	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	4
1150	R	2,048	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	>64
933	R	2,048	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	4
916	R	2,048	128	2,048	1,024	2,048	R	R	R	R	4

^a The MIC value was defined as the lowest concentration of the antifungal agent and were read after two days at 37 °C. The inoculum sizes contained approximately 2.5 x 10³ cells/mL. Culture media tested were the RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). The final concentration of triazoles was between 4-2,048 µg/mL and 0.125-64 µg/mL for fluconazole.

^bFluconazole

^c*Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used as reference strain.

R=Resistance

***In vitro* and *in vivo* evaluation of new triazole-loaded liposomes
against *Candida* strains**

Reginaldo G. Lima-Neto^a; Rejane P. Neves^a; Janaína V. Anjos^b; Isabella M. F. Cavalcanti^c; Milena S. Ferraz^e, Almir G. Wanderley^d; Nereide S. Santos-Magalhaes^{c,*}

^a Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil.

^b Departamento de Química Fundamental, UFPE, Recife, Brazil.

^c Laboratório de Imunopatologia Keiso-Azami, UFPE, Recife, Brazil.

^D Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE, Recife, Brazil

Abstract

The *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (TZL) and formulation containing this triazole loaded with liposomes (TZL-Lipo) were assessed against clinical isolates of *Candida*. Triazole-loaded liposomes were prepared by redispersion of thin film lipids. Stability of the TZL-Lipo were studied by accelerated and long-term stability tests. The minimal inhibitory concentration (MIC) *in vitro* of TZL and TZL-Lipo against 42 *Candida* species was determined. In order to evaluate the efficacy of TZL-Lipo was administered intraperitoneally to neutropenic animals, in a murine candidiasis model. Fluconazole was used as reference drug. The profiles as antifungal agents were evaluated according to the *in vitro* and *in vivo* tests results, and to their blood samples. Best results in drug formulation stability were obtained with negatively-charged liposomes. The MICs of TZL and TZL-Lipo ranged between 64 to 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 128 to 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively, indicating moderate activity against *Candida* strains. The candidiasis murine model showed that the survival rate was better in group treated with TZL-Lipo than with fluconazole ($P<0.05$) showing a low toxicity profile for the new formulation. Investigations like this are carried out using *in vitro* tests or animal infection models, and the results are used for optimizing dosing and to define clinical resistance or as to the susceptibility.

Key words: Triazole, Liposomes, Candidiasis, *In vitro* antifungal activity, Animal model

1 Introduction

Fungal infections have increased significantly and emerged over the past few decades (Lopez-Martinez, 2010). There is a clear need for the development of effective antimycotic therapeutic agents for the treatment of these infections, since all the major classes of antifungal drugs available have encountered resistance in clinical use (Chen and Sobel, 2005; Rybak and Akins, 2001). Among these classes, azoles are the most broadly used in clinical applications because of their general spectrum and high potency (Sheehan et al., 1999).

The triazole nucleus is present in many antifungal agents and, because of that, it is used for the treatment of superficial and invasive fungal infections (Hoffman et al., 2000, Ulusoy et al., 2001, Demirbas et al., 2005). These molecules act by inhibiting competitively the lanosterol 14 α -demethylase (a cytochrome P-450 enzyme), leading to a decrease in fungal biosynthesis of ergosterol, which is a key compound of fungal cell membrane, thereby preventing fungal growth (Wei et al., 2006).

Several attempts have been made aiming to minimize the side effects of antifungal drugs through of new pharmaceutical form, such as the amphotericin B new formulation, currently available encapsulated into a liposome (Galvada et al., 2005; Olson et al., 2005). Due to the low solubility and to the significant nephro and hepatotoxicities (Wang et al., 2010), the development of new pharmaceutical formulations for a triazole drug administration might therefore be desirable.

There has been a constant interest in liposomes as vehicles for delivering drugs to the human body. They have been utilized as carriers for lipophilic drugs, once they can stabilize these compounds, conferring more resistance to hydrolysis and reducing the major drug toxicity (Santos-Magalhães et al., 2000). In addition, it can be noticed that the clinical applications of liposomes are mainly in the treatment of bacterial and fungal infections, as well as cancer (Torchilin, 2005, 2006).

Within this framework, the aim of this work was to develop a liposomal formulation containing 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol, a 1,2,3-triazole class substance (Fig. 1).

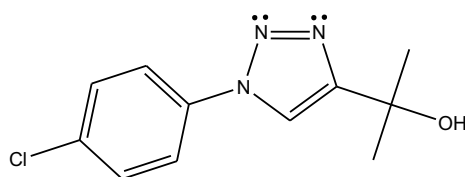


Fig.1. Structure of 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol evidencing the non-bonding electron pairs in N-2 and N-3 of the triazole nucleus.

This drug was chosen because of its potential as an antifungal agent according with prior analyses, capable of being used in a drug delivery system. The liposomal formulations had their antifungal activity evaluated *in vitro* and in a candidiasis murine model. Herein, we describe the preparation and the characterization of the triazole-loaded liposomes, as well as the *in vitro* kinetic studies of the liposomal formulations.

2 Material and methods

2.1 Strains and growth cultures

Twenty strains of *C. albicans*, five of *C. krusei*, eleven of *C. parapsilosis* and five of *C. tropicalis* were supplied by the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Center of Biological Sciences Centre of the Federal University of Pernambuco. Strains have been stocked in mineral oil at 18 °C (Sherf, 1943). Viability tests of all strains and subsequent taxonomic confirmation of their morphological, biochemical and physiological characteristics were carried out (Hoog and Guarro, 2000). Species, accession numbers, stock time and isolation substratum are summarised in Table 1. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used as a reference strain.

2.2 Antifungal activity

The method used followed the conditions reported in M27-A3 (CLSI, 2008). The culture medium used during the experiments was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) with L-glutamine and without sodium bicarbonate, pH 7.0 ± 0.1 , with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; 0.165 mol.L^{-1} ; Sigma-Aldrich). The medium was filter-sterilized in 0.22μ membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). The commercial drug used for comparison was fluconazole (Pfizer, New York, USA), prepared in distilled water. Different concentrations of fluconazole (FZL) were used, ranging from 0.125 to $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. 2-[1-(4-Chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (TZL) was diluted in DMSO with stock solutions of concentration $1,024 \text{ mg.mL}^{-1}$. The tested concentrations of TZL ranged from 2 to $1,024 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The *Candida* spp. were maintained on Sabouraud dextrose agar (SDA) medium and incubated at 35 °C. Suspensions of the isolates were prepared, and their density was adjusted according to the 0.5 MacFarland standard for 90% transmission using a

spectrophotometer. The volume of the inoculum was adjusted to 5.0 mL of sterilized saline and was further diluted in RPMI 1640 to a concentration of 2.5×10^3 cells.mL⁻¹.

For the susceptibility tests, sterilized flat-bottomed 96 well microtitre plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) were used. The inoculum was added to the wells with the tested drugs, and the plates were incubated at 25°C for two days before reading the results to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of the FZL and TZL. The MICs for TZL and FZL were determined in order to present 100% and $\geq 80\%$ of fungal growth inhibition in relation to fungal growth in controls. For determining the minimal fungicide concentration (MFC) of TZL, the content of the wells that showed 100% growth inhibition were transferred onto SDA in Petri dishes. The dishes were then incubated at 35°C for 3 days to determine the fungal viability. The MFC was confirmed by the absence of fungal growth.

The TZL sensitivity was determined according to the M27-A3 reference method (CLSI, 2008), based on the sensitivity range of FLZ (≤ 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Each experiment was performed in duplicate. The MIC and MFC for each antifungal were determined. Triazole-loaded liposomes (TZL-Lipo) was tested under the same concentrations and was MIC determined under same conditions of TZL, however was not diluted in DMSO, but added directly to 96 well microtitre plates with RPMI after formulation.

2.3 Preparation of triazole-loaded liposomes

Triazole-loaded liposomes (TZL-Lipo) were prepared using the thin lipid film method (Andrade et al., 2004). Briefly, lipids (soybean phosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine 7:2:1 molar ratio) and triazole (TZL; 1.0-4.0 mg/mL) were dissolved in a mixture of CHCl₃:MeOH (3:1 v/v) under magnetic stirring. The final concentration of lipids was 42 mM. The solvents were removed under vacuum for 60 min (37 ± 1 °C, 80 rpm), resulting in a thin lipid film formation. This lipid was then hydrated with 10 mL of pH 7.4 phosphate buffer solution, producing multilamellar liposomes (MLV). The liposomal suspension was kept under magnetic stirring for 5 min and was then sonicated (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s to produce small unilamellar liposomes (SUV). The liposomes were also lyophilized under 4×10^{-6} bar at -80 °C using trehalose as a cryo-protector in the freeze-drying process (1 g of trehalose that represents 10 % of the formulation total volume).

2.4 Characterization and physicochemical evaluation of the formulations

The stability of TZL-Lipo was evaluated by using standard accelerated and long-

term tests. Samples of liposomal suspension were submitted to centrifugation (1,300 *g* for 1 hour at 25 °C), horizontal mechanical stirring (180 strokes/min for 48 hours at 37 °C), and freeze-thaw cycles (−18 °C for 16 hours and 25 °C for 8 hours).

The physicochemical analysis was carried out immediately after preparation. Parameters such as the macroscopic appearance, morphological examination, particle mean diameter, pH changes, TZL content into liposomes, encapsulation ratio and zeta potential were analyzed. An aliquot of liposomal sample (25 µL) was diluted to 10 mL with methanol and then sonicated for 5 minutes for determining the TZL content by spectrophotometry at 253 nm using a TZL standard curve with concentrations varying from 0.5 to 3 µg/mL. Drug-encapsulation efficiency of TZL in liposomes was determined by the ultrafiltration/ultracentrifugation technique using Ultrafree® units (Millipore, USA). After centrifugation of the TZL-Lipo samples (Ultracentrifuge KT 20000, Kubota, Japan) at 8.776 *g* for 1 h at 4 °C, the TZL concentration in the supernatant was also measured by UV spectrophotometry at 253 nm and the TLZ encapsulation ratio calculated in relation to its initial content in the liposome formulation. The zeta potential (ξ) of the liposomes was measured (Zetatrac NC-148, Microtrac) to analyze the surface charge of the vesicles. In this experiment 50 µL of the liposome dispersions were diluted with 5 mL of purified water and analyzed.

2.5 *In vitro* release kinetics of triazole from liposomes

The *in vitro* release kinetics of TZL from liposomes was analyzed using the dialysis technique against pH 7.4 phosphate buffer solution at 37 °C under sink conditions. Briefly, an aliquot of the liposomal formulation (2 mL) containing TZL was inserted into a dialysis membrane (MW cut-off 12,400), which was subsequently sealed and suspended in the release medium (80 mL). The system was maintained under magnetic stirring at 37 °C. At appropriate intervals, 1 mL samples of the release medium were removed and assayed for TZL detection by spectrophotometer at 253 nm. A standard curve of TZL from 0.5 to 3 µg/mL concentrations was used to determine 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol concentration. After collection, the release medium was replaced by fresh phosphate buffer solution (1 mL). The *in vitro* release kinetics of free TZL was also performed as described herein.

The kinetic data of TZL from liposomal formulations were fitted according to an exponential model using the following equation: $M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$ where, M_t and M_∞ are the mass of the drug released at a determined time (*t*) and at an infinite time (t_∞)

of the kinetic process, respectively; k_1 is a fitting constant, and k_2 is the kinetic rate constant.

2.6 Animals and immunosuppressive treatment

Female mice, eight to twelve-week-old, weighing 250 g were kindly provided by the Pharmacology and Physiology Laboratory (UFPE) and used for all *in vivo* tests. Mice were bred under specific pathogen-free conditions. The animals were handled according to established experimental procedures following approval by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (process n° 23076.003830/2008-76). In addition, the procedures involving animals and their care were conducted in conformity with international laws and policies.

For immunosuppression, a neutropenic murine disseminated candidiasis model was established for all studies (Andes et al., 2008). Mice were rendered neutropenic (polymorphonuclear cell count $<100/\text{mm}^3$) by injecting cyclophosphamide (Mead Johnson Pharmaceuticals, Evansville, IN) subcutaneously 4 days before fungal infection (150 mg/Kg of body weight), 1 day before infection (100 mg/Kg) and 2 days after infection (100 mg/Kg). Total leukocyte count in the blood of the immunosuppressed (IS) animals in comparison to the immunocompetent (IC) animals was used to confirm immunosuppression.

2.7 Infection model

Candida albicans URM 3719 was cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plus yeast extract 48 h prior to infection. The inoculum was prepared by placing five colonies into 5 mL of sterile pyrogen-free 0.9% saline. The final inoculum was adjusted to 10^8 cells/mL by Neubauer Chamber and organism grew as an essentially pure yeast-phase population. After adjusted, cells were harvested by low-speed centrifugation (1000 g) and washed with saline. Disseminated infection with the *Candida* strain was achieved by the injection of 0.2 mL of the inoculum via intraperitoneal 24h prior to start drug therapy. The cell viability was $>95\%$ measured by trypan blue exclusion. Yeasts cells in blood of infected mice (six per group) were re-obtained by plate culture with SDA.

2.8 Antifungal agents and therapy

Fluconazole was diluted in PBS and given intragastrically daily for 5 consecutive days after challenge at 200mg/Kg/day. TZL-Lipo was given intraperitoneally daily for 5 consecutive days after challenge at 24mg/Kg/day. Both treatments were carried out in

six mice per experiment after the immunosuppressant agent administration and *Candida* infection. In order to evaluate the formulations profiles, one group (six mice) was immunosuppressed but not infected and other group was immunosuppressed with subsequent infection. Both groups were used as controls.

The efficacy of the different drugs was evaluated through prolongation of mice survival and absence of yeast in blood samples of mice challenged. For the survival evaluation tests and blood samples studies, groups of six mice were randomly chosen for treatments and controls. For survival studies, mice were checked daily during 28 days. Blood samples were taken, one, three, seven and fifteen days after challenge. All surviving animals were analyzed.

2.9 Statistical analysis

Mean survival time among groups was estimated by One-way analysis of variance using Tukey's Multiple Comparison and significance was defined as $P < 0.05$. Assays were carried out in triplicate for each experiment. Statistical analysis was calculated using GraphPad Prism 4 (GraphPad software, CA, USA).

3 Results

3.1 Characterization of triazole-loaded liposomes

Different batches of TZL-Lipo were prepared in order to achieve a stable formulation. Characteristics of the positively and negatively charged liposomes obtained are summarized in Table 2. Liposomal formulations exhibited a bluish reflection characteristic of small unilamellar vesicles whatever the triazole concentration (1–4 mg/mL). These preparations remained stabilized for 180 days when stored in suspension form at 4 °C exhibiting drug precipitation and lipid flocculation after this time.

A typical negatively charged formulation of TLZ-Lipo composed of 42 µmol of lipids/10 µL of pH 7.4 phosphate buffer solution and 4 mg/mL of TZL was chosen for carrying out *in vitro* and *in vivo* studies. The content of TZL in liposomes was 95.27% and the encapsulation ratio was 82.42%. In addition, negative formulations preserved their stability after accelerated and long-term stability testing without significant changes to their initial characteristics after hydration of the lyophilized liposomal form.

3.2 Kinetics of release of triazole from triazole-loaded liposomes

The *in vitro* kinetic profile of 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-

propan-2-ol (TZL) released from liposomal formulation is showed in Figure 2. Almost 70% of TZL released practically at 3 h, corresponding to the initial burst effect, followed by a linear release with 80% at 10 h, reaching 92% in 20 h. The kinetics of release of triazole from the liposomes was fitted according to an exponential model $M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$, yielding $M_\infty = 5,855 \mu\text{g}$, $k_1 = 0.309$ and $k_2 = 0.055 \text{ h}^{-1}$ with a correlation coefficient of $r^2 = 0.9535$.

3.3 Antifungal activity *in vitro*

The results of the antifungal activity by MIC measured visually are described in Table 1. All the analysed *Candida* strains have MIC determined to TLZ, TLZ-Lipo and FLZ. TLZ showed fungistatic activity in concentrations ranging from 64 to 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and fungicidal activity in concentrations from 64 to 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. TLZ-Lipo showed fungistatic activity in concentrations ranging from 128 to 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and fungicidal activity in concentrations from 128 to 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The isolates numbered 4125, 4126 and 4127 showed the same activity for fungistatic and fungicidal concentrations for TZL (128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 4125 and 4126; 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 4127) and TZL-Lipo (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 4125 and 4126; 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 4127).

Fluconazole showed only fungistatic activity in concentrations ranging from 0.5 to 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, where eight isolates were dose dependent presenting MIC between 16-32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and nine were resistant with MICs $\geq 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

For each experiment, the inoculum controls produced clearly detectable growth after the chosen incubation period, indicating that all isolates were viable and that the conditions used were suitable for fungal growth.

3.4 Antifungal activity *in vivo*

We have previously noted that mice infected systemically with yeast strain URM 3719 showed a dramatically different pattern of mortality when compared with others strains previously used in our laboratory. Deaths resulting from systemic infection with 10^8 yeasts/mL of URM 3719 typically occurred within 12 days, after which there was no further mortality. After infection with the same dose of others yeasts pathogens survival rate of the mice was high. Figure 3 shows the results of survival studies obtained with the strain tested. Treatment with fluconazole did not modify the survival of infected mice in relation to the control group II (mice immunosuppressed and infected), but TZL-loaded liposome decreased the rate of death of the mice and have not statistically significant difference regarding the control group I (mice only

immunosuppressed) which showed very low mortality.

The blood samples cultured in SDA evidenced infection successfully in all mice until three days after challenge. None yeast was re-obtained after 15 days of the mice survivors.

4 Discussion

Candida species are amongst the most common causes of human mycoses (Lima-Neto et al., 2011). Therefore, considerable research effort has been devoted to the development of new more efficient drugs-with less side effects. The potential use of encapsulation into liposomes in quest of an improvement in the pharmacokinetics and therapeutic efficacy of drugs has been reported in the literature (Lira et al., 2009). The elected antifungal drug used in this work, 2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-yl]-propan-2-ol (TZL) has a predicted pKa value of 9.53 according to theoretical semi-empiric calculations (Stewart, 2007, 2008). In fact, it can be noticed that there are two non-bonding electron pairs in the nitrogen atoms of the triazole heterocycle, showing that this nucleus can play a hydrogen bond acceptor role in biological systems (Kolb and Sharpless, 2003). Another feature concerning this compound is his amphiphilic character. This is due to the aromatic rings in one side of the molecule (apolar portion) and to the hydrophilic hydroxyl group present at the other side (Fig. 1), showing that TZL structure can be compatible with the liposomal media and conferring certain stability to the formulation.

In this work, we obtained a formulation with negative electronic density similar to AmBisome®, single liposomal formulation available commercially against pathogen fungal. This surface negative charge of liposomes produces an eletrostatic incompatibility with the cell of the mammals minimizing its toxicity, besides provides electrostatic attraction with the fungal cell and, consequently, high concentrations in the target infectious (Anaissie et al., 1991; Ostrosky-Zeichner et al., 2003).

Data reported in Table 1 show that new TZL as well as liposomal formulation (TZL-Lipo) presented similar moderate anti-*Candida* activity against fungi tested. It was also noted that, these active compounds showed fungicidal and not only fungistatic effect against all yeasts tested. Moreover, we observed in our infection model that only immunosuppressant does not lead to significant rates of death. However, infection after immunosuppressant is almost lethal. Whereas the treatment with encapsulated triazole

prolonged the survival of mice infected (group IV), showing no significant statistical differences with group I, we observed that fluconazole mice-treatment (group IV) not significantly delayed the survival of mice infected showing no significant statistical differences with group II.

The comparative effectiveness of the triazole liposomal formulation and fluconazole can be controversial because of the use of different administration routes. This variability makes it difficult to demonstrate significant differences in efficacy in clinical practice. However, using candidiasis murine model, Anaissie et al. (1994) showed a positive correlation between the anticandidal activity of amphotericin B and fluconazole. Moreover, their ability to prolong survival and reduce tissue counts in infected mice even when administered by different routes. According to Cenci et al. (1997) more relevant than compare same administration routes should be the capacity of interaction of either drug with *C. albicans* or host defense mechanisms, leading to an effective control of fungal growth.

The new triazole liposomal formulation is an interesting approach to afford commercially available efficient antifungals systems. We tested and warrant future studies with other fungal species and different infection types.

References

- Anaissie, E., Paetznick, V., Proffitt, R., Adler-Moore, J., Bodey, G.P., 1991. Comparison of the *in vitro* antifungal activity of free and liposome encapsulated amphotericin B. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 655-668.
- Anaissie, E.J., Karyotakis, N.C., Hachem, R., Dignami, M.C., Rex, J.H., Paetznick, V., 1994. Correlation between *in vitro* and *in vivo* activity of antifungal agents against *Candida* species. J. Infect. Dis. 170, 384-389.
- Andes, D., Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Prince, R.A., Marchillo, K., Ashbeck, J., Hou, J., 2008. *In Vivo* Pharmacodynamic characterization of anidulafungin in neutropenic murine candidiasis model. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 539-550.
- Andrade, C.A., Correia, M.T., Coelho, L.C., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. Int. J. Pharm. 278, 435-445.
- Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bistoni, F., Romani, L., 1997. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. J. Infect. Dis. 176, 217-226.
- Chen, A., Sobel, J.D., 2005. Emerging azole antifungal. Expert. Opin. Emerg. Drugs. 10, 21-33.
- CLSI, 2008. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.
- Demirbas, N., Demirbas, A., Karaoglu, S.A., 2005. Synthesis and biological activities of new 1,2,4-triazol-3-one derivatives. Bioorg. Khim. 31, 430-440.
- Gavaldà, J., Martín, T., López, P., Gomis, X., Ramírez, J.L., Rodríguez, D., 2005. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. Clin. Microbiol. Infect. 11, 999-1004.
- Hoffman, H.L., Ernst, E.J., Klepser, M.E., 2000. Novel triazole antifungal agents. Expert. Opin. Invest. Drugs. 9, 593-605.
- Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, Utrecht.
- Kolb, H.C., Sharpless, K.B., 2003. The growing impact of click chemistry on drug discovery. Drug. Disc. Today. 8, 1128-1137.

- Lima-Neto, R.G., Beltrão, E.I.C., Oliveira, P.C., Neves, R.P., 2011. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses*. 54, 23-29.
- Lira, M.C.B., Siqueira-Moura, M.P., Rolim-Santos, H.M.L., Galetti, F.C.S., Simioni, A.R., Santos, N.P., Egito, E.S.T., Silva, C.L., Tedesco, A.C., Santos-Magalhaes, N.S., 2009. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J. Lip. Res.* 19, 49-58.
- Lopez-Martinez, R., 2010. Candidosis, a new challenge. *Clin. Dermatol.* 28, 178-184.
- Olson, J.A., Adler-Moore, J.P., Smith, P.J., Proffitt, R.T., 2005. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4895-4902.
- Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K.A., Rex, J.H., Cohen, S.H., 2003. Amphotericin B: time for new gold standart. *Clin. Infect. Dis.* 37, 415-425.
- Rybak, M.J., Akins, R.L., 2001. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptide resistance: clinical significance and treatment options. *Drugs*. 61, 1-7.
- Santos-Magalhães, N.S., Pontes, A., Pereira, V.M.W., Caetano, M.N.P., 2000. Colloidal carriers for benzathine penicilin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 208, 71-80.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M., 1999. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 40-79.
- Sherf, A.F., 1943. The method for maintaining *Phytophthora sepedomica* for long periods without transf. *Phytopathology*. 31, 30-32.
- Stewart, J.J.P., 2007. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements *J. Mol. Modeling*. 13, 1173-1213.
- Stewart, J.J.P., 2008. [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net). Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs.
- Torchilin, V.P., 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug. Discov.* 4, 145-160.
- Torchilin, V.P., 2006. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 58, 1532-1555.
- Ulusoy, N., Gursay, A., Otuk, G., 2001. Synthesis and antimicrobial activity of some 1,2,4-triazole-3-mercaptoacetic acid derivatives. *Farmaco*. 56, 947-952.
- Wang, J.L., Chang, C.H., Young-Xu, Y., Chan, K.A., 2010. Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and

definitive therapy for invasive fungal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2409-2419.

Wei, Q.L., Zhang, S.S., Gao, J., Li, W.H., Xu, L.Z., Yu, Z.G., 2006. Synthesis and QSAR studies of novel triazole compounds containing thioamide as potential antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7146-7153.

Table 1. Antifungal activity of a new triazole, triazole-loaded liposomes and fluconazole against *Candida* strains.

Species	Accession n° (URM)	Storage (years)	Substrate	MICs (µg/mL)		
				TZL	TZL-Lipo	FLZ
<i>C. albicans</i>	4990	01	Vaginal secretion	256	512	>64
<i>C. albicans</i>	4987	01	Vaginal secretion	128	256	16
<i>C. albicans</i>	4986	01	Vaginal secretion	128	256	16
<i>C. albicans</i>	4820	02	Ungual scrap	256	512	4
<i>C. albicans</i>	4819	02	Ungual scrap	128	256	4
<i>C. albicans</i>	4817	02	Ungual scrap	128	256	4
<i>C. albicans</i>	4609	03	Blood	128	256	4
<i>C. albicans</i>	4606	03	Blood	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4388	05	Oropharyngeal secretion	128	256	>64
<i>C. albicans</i>	4387	05	Oropharyngeal secretion	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4386	05	Oropharyngeal secretion	128	256	1
<i>C. albicans</i>	4385	05	Oropharyngeal secretion	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4384	05	Oropharyngeal secretion	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4260	05	Oropharyngeal secretion	128	256	2
<i>C. albicans</i>	4127	07	Inguinal area	128	256	0.5
<i>C. albicans</i>	4126	07	Urine	128	256	0.5
<i>C. albicans</i>	4125	07	Spittle	256	512	0.5
<i>C. albicans</i>	4124	07	Oropharyngeal secretion	256	512	>64
<i>C. albicans</i>	3719	10	Tooth scrap	256	512	64
<i>C. albicans</i>	3716	10	Tooth scrap	256	512	0.5
<i>C. krusei</i>	4802	02	-	256	512	64
<i>C. krusei</i>	4263	05	Oropharyngeal secretion	256	512	64
<i>C. krusei</i>	1059	48	-	64	128	16
<i>C. krusei</i>	934	49	Appendix biopsy	256	512	64
<i>C. krusei</i>	109	52	-	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4984	01	Vaginal secretion	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4970	01	Vaginal secretion	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4889	02	Blood	64	128	2
<i>C. parapsilosis</i>	4818	02	Ungual scrap	128	256	4
<i>C. parapsilosis</i>	4804	02	IFM	128	256	8
<i>C. parapsilosis</i>	4608	03	Blood	128	256	16
<i>C. parapsilosis</i>	4607	03	Blood	128	256	4
<i>C. parapsilosis</i>	4261	05	Oropharyngeal secretion	256	512	>64
<i>C. parapsilosis</i>	3627	12	Spittle	64	128	0.5
<i>C. parapsilosis</i>	3624	12	Spittle	64	128	0.5
<i>C. parapsilosis</i>	3621	12	Spittle	64	128	0.5
<i>C. parapsilosis</i> ^e	ATCC22019	-	-	256	512	8
<i>C. tropicalis</i>	4790	02	Cassava powdery	128	256	32
<i>C. tropicalis</i>	4262	06	Oropharyngeal secretion	128	256	4
<i>C. tropicalis</i>	1150	46	Tongue	128	256	>64
<i>C. tropicalis</i>	933	49	Vaginal secretion	128	256	4
<i>C. tropicalis</i>	916	49	Feces	128	256	4

^a The MIC value was defined as the lowest concentration of the antifungal agent and was read after two days at 37 °C. The inoculum sizes contained approximately 2.5×10^3 cells/mL. Culture media tested were the RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). The final concentration of triazole was between 2-1.024 µg/mL and 0.125-64 µg/mL for fluconazole.

TZL = Triazole

TZL-Lipo = Triazole-loaded liposome

FLZ = Fluconazole

Candida parapsilosis ATCC 22019 was used as the reference strain.

Table 2. Pre-formulation study and physicochemical characteristics of triazole-loaded liposomes obtained with five different molar ratio of triazole:lipids.

* Formulation presented drug precipitation

TZL:lipid molar ratio	Lipids (mM)	TZL (mg/mL)	Micro and macroscopic Appearance	Ø (nm)	ξ (mV)	pH
1:9.98	42	1	Stable	88.3	3.37 ± 0.66	7.32 ± 0.1
1:4.99	42	2	Stable	90.9	2.93 ± 0.23	7.54 ± 0.1
1:3.33	42	3	Stable	96.5	2.92 ± 0.23	7.56 ± 0.1
1:2.50	42	4	Stable	109.8	-24.30 ± 1.79	7.64 ± 0.1
1:2.00	42	5	Unstable*	-	-	-

- Parameters no evaluated

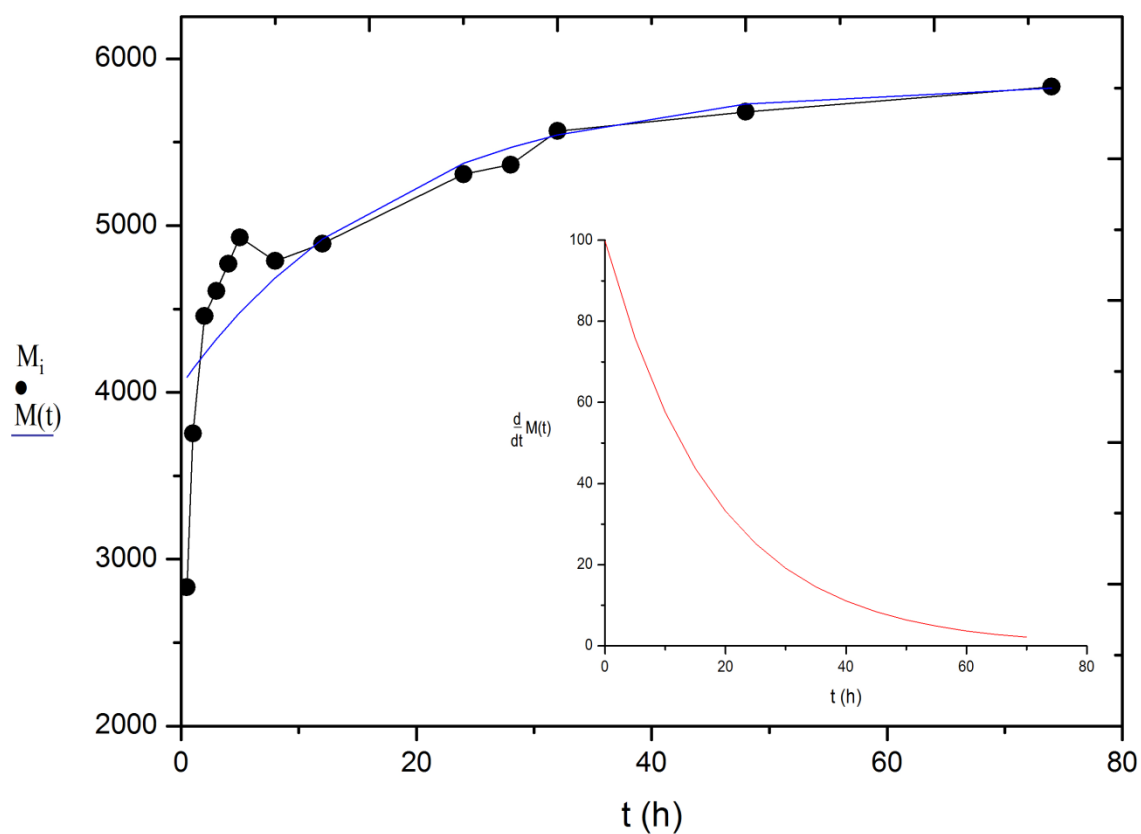


Figure 2. *In vitro* release profiles of triazole encapsulated into negatively charged liposomes (4 mg/mL) in phosphate buffer solution (pH 7.4) at 37 °C. Results are mean values of three assays.

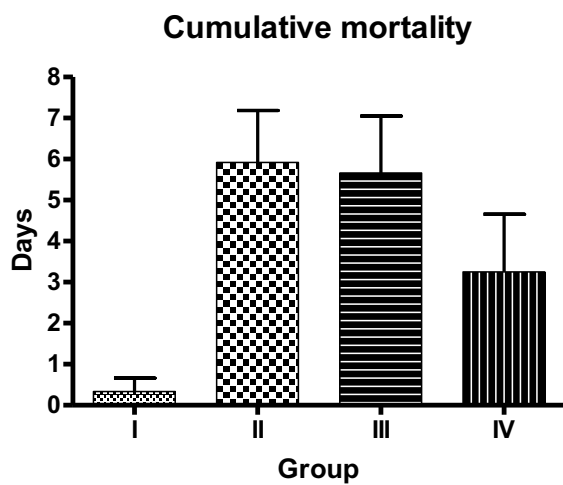


Figure 3. Mean cumulative mortality in days post-immunosuppressant of mice infected with *C. albicans* URM 3719. I, group only immunosuppressed; II, group immunosuppressed with subsequent infection; III, group immunosuppressed, infected and treated with fluconazole; IV, group immunosuppressed infected and treated with TZL-Lipo. $P < 0.01$ in I versus II and $P < 0.05$ in I versus III, but $P > 0.05$ in I versus IV.

Classical Phenotypical *versus* New Spectral (MALDI-TOF ICMS) Identification of Clinical Isolates of *Candida*

Reginaldo Lima-Neto¹, Cledir Santos², Nelson Lima², Paula Sampaio³, Célia Pais³ and
Rejane P. Neves¹

¹Centre of Biological Sciences, Department of Mycology, Federal University of Pernambuco (UFPE),
Cidade universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil

²IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do
Minho, Braga, Portugal

³Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), University of Minho, Campus of Gualtar,
4710-057 Braga, Portugal

Abstract

The significant increase in the frequency of candidiasis wide world has promoted the study and development of fast and reliable techniques aimed at the replacement of traditional methods used for identification and typing of *Candida* clinical isolates. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Intact Cell Mass Spectrometry (MALDI-TOF ICMS) is a very rapid and reliable physic-chemical technique capable to identify microorganisms at the species and in some particular taxa also at the strain level. The aim of the present work was to compare the discriminative capability between the classical phenotypical approach, including morphological and biochemical analysis, and the new spectral method by MALDI-TOF ICMS of *Candida* species from clinical cases. The results obtained provide evidence that MALDI-TOF ICMS represents a rapid means of sorting such microorganisms. The classical phenotypical data shows *c.a.* 27.0% of incongruence to the MALDI-TOF ICMS analyses at the microbial species level. The discordant isolates were complementary analysed by ITS sequencing and the results from molecular biology corroborate MALDI-TOF ICMS identifications. Additionally, the main hindrance of the new phenotypical spectral technique during the identification process is the microbial diversity storage in the database.

Keywords: *Candida*, MALDI-TOF ICMS, Spectral Analysis, Molecular Analysis, Classical Taxonomy

1. Introduction

The number and clinical impact of severe infections due to yeast species has greatly increased in the last years, particularly in immunocompromised hosts (Marklein et al. 2009). Yeasts belonging to the genus *Candida* have emerged as the major opportunistic pathogens in these patients and currently, *Candida* genus constitutes one of the most common cause of nosocomial infections in intensive care units (Marklein et al. 2009). *Candida* is a complex genus comprising 163 anamorphic species. Since the last few years only a small number of pathogenic species of *Candida* were known, namely *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* and *C. glabrata*. However, in recent years the number of species related to human infections has increased considerably (Putignani et al. 2010). About 20 species of *Candida* have been shown to cause disease in humans, but the list of medically important species continues to grow (Correia et al. 2006). With an estimated total of 72.8 million opportunistic *Candida* infections per year worldwide, the case/fatality rate due to *Candida* species is in the range of 33.9% (Marklein et al. 2009).

MALDI-TOF ICMS technique to detect and differentiate yeasts are now able to distinguish closely related species, like *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. bracarensis* (Santos et al. 2011) previously separated by molecular biology and conventional chemotaxonomic criteria (Sullivan et al. 1995; Tavanti et al. 2005, Correia et al. 2006).

Several reports have addressed the difficulty of identifying yeast strains to the species level by conventional methods, since they are highly dependent on variables such as growth medium and temperature (Cendejas-Bueno et al. 2010). There is an overabundance of identification methods, ranging from rapid techniques such as selective media like Chromagar *Candida*, to a huge number of fastidious procedures such as molecular biology approaches. Some of them are simple and especially applicable to the presumptive identification of *Candida albicans* from other yeasts, whereas others provide rapid presumptive identification of most *Candida* species and can even distinguish between strains of a given species. These methods can be either time-consuming and/or require considerable expertise (Qian et al. 2008). However, the expertise on the classical phenotypical and modern molecular biology approaches is crucial when the mycologist faces an isolate with unusual traits.

Death rates and costs associated with infectious diseases could be significantly reduced by employing new rapid identification techniques (Essendoubi et al. 2005). These constraints have led to an increase interest in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) technique for rapid and reliable microbial identifications.

The aim of the present work was to compare the discriminative capability between the classical phenotypical approach, including morphological and biochemical analysis, and the new spectral method by MALDI-TOF ICMS of *Candida* species from clinical cases, most of them from deep sites.

All 41 isolates were firstly identified using a classical phenotypical approach. Then, all isolates were identified by MALDI-TOF ICMS technique. Finally, a representative group of isolates that presented incongruent results between these two approaches were analysed by molecular biology technique. In order to provide information to their clinical management the susceptibility profiles of two antifungal agents against these isolates were also evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Growth conditions: All 41 yeasts cultures analysed in this study were obtained from the URM Culture Collection (<http://www.ufpe.br/micoteca/historico.php>). *Escherichia coli* strain DH5a was obtained from the Micoteca da Universidade do Minho (MUM, www.micoteca.deb.uminho.pt). *Trichophyton rubrum* was obtained from MUM and incorporated in the analysis as an out-group. All cultures were got from cryovials preserved on deep-freeze at -80 °C. Cryovials were thawed, opened and the strains cultured according to the instructions issued by URM-UFPE and MUM. Homogenous inocula of yeast cells were grown and maintained on Yeast Extract Peptone Dextrose medium (YEPD). *E. coli* cells were grown and maintained on Luria-Bertani medium agar (LB). Incubations were standardised at 20 h and strains were grown aerobically at 37 °C. All cultures were checked for purity prior to use and were sub-cultured at least once prior to MALDI-TOF ICMS analysis.

2.2 Classical Phenotypical Identification: These analyses were performed at the Laboratory of Clinical Mycology of the Department of Mycology, Federal University of

Pernambuco, Recife, Brazil. For these studies all 41 isolates were identified through macro- and micro-morphology analyses. The colour, shape and topology of each colony as well as the cellular morphology of each isolate were taken in consideration in this study. These isolates were also identified biochemically by auxonogram and zimogram assays and by induction of reproductive structure, clamidospores and urease production. Seven from the 41 isolates presented dubious identification through classical phenotypical identification. In order to clarify phenotypically the identification these 7 isolates were analysed by VITEK 1 at the Laboratory of Clinical Analysis of the Royal Portuguese Hospital, Recife, Brazil.

2.3 MALDI-TOF ICMS flex target plate preparation: A loopful of cells was directly transferred from the culture medium and spotted onto the 48 well flex target plate. Immediately, for all yeast samples 0.5 mL of 25% formic acid was added and mixed gently with biological material. When the liquid medium was almost evaporated, 0.5 ml matrix solution (75 mg/ml 2,5-dihydroxybenzoic acid [DHB] in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1] with 0.03% trifluoroacetic acid [TFA]) was added and mixed gently. For *E. coli* the matrix solution addition was performed without previous treatment with formic acid. All sample mixtures were air dried at room temperature. Each sample was spotted in duplicate to test reproducibility. During the analyses all solutions were prepared and storage at +5 °C.

2.4 MALDI-TOF ICMS data acquisition: The analyses were performed in the Laboratory of Mycology and Molecular Biology of Centre of Biological Engineering of University of Minho on an Axima LNR system (Kratos Analytical, Shimadzu, Manchester, UK) equipped with a nitrogen laser (337 nm), where the laser intensity was set just above the threshold for ion production. *E. coli* DH5 α strain with known mass values of ribosomal proteins was used as external calibration. The mass range from 2000 to 20000 Da was recorded using the linear mode with a delay of 104 ns and using an acceleration voltage of +20 kV. Final spectra were generated by summing 20 laser shots accumulated per profile and 50 profile produced per sample, leading to a total of up to 10800 laser shots per summed spectrum. The resulting peak lists were exported to the SARAMIS™ software package (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Postdam-Golm, Germany, www.anagnostec.eu) where the final

identifications were achieved. Identification by SARAMIS™ package is based just on the presence or absence of each peak in the spectra.

2.5 MALDI-TOF ICMS clustering analysis: Cluster analysis of the MALDI-TOF ICMS mass spectral data were achieved using SARAMIS™ database. In SARAMIS™ database peak lists of individual samples were compared to SuperSpectra and/or reference spectra. It generated a ranked list of matching SuperSpectra and reference spectra. For both SuperSpectra and reference spectra SARAMIS™ uses a point system based on peak list with mass signals weighed according to their specificity. The weighting is based on empirical data from multiple samples of type, reference and well characterised strains. SuperSpectra are consensus spectra containing a pattern of mass signals which are specific for individual microbial *taxa* and allow the identification of specimens as well as cluster analyses of spectra of multiple samples. Reference spectra are individual empiric spectra of undoubtedly species isolates. For both cases the similarity between individual spectra is expressed as relative or absolute number of matching mass signals after subjecting the data to a single link agglomerative clustering algorithm.

2.6 ITS sequencing and sequence analysis: These analyses were performed at the Laboratory of Microbiology of the Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), University of Minho, Braga, Portugal. Eight isolates that presented distinctive identification by the classical and new spectral phenotypic approaches were analysed by ITS sequencing. Sequence analysis was carried out on the entire ribosomal ITS region (i.e. ITS1/5-8S rDNA/ITS2), according to White *et al* (1990). Sequencing was performed with an ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using standard protocols. Strains were identified at the level of 95.0% sequence similarity or higher after a NCBI blast.

2.7 Susceptibility profiles antifungal agents: These analyses were performed at the Laboratory of Clinical Mycology of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. All 41 isolates were evaluated concerning their susceptibility profiles for the antifungal agents'. The method used followed the conditions reported in M27-A3 (CLSI, 2008). The culture medium used during the experiments was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) with L-glutamine free of sodium bicarbonate and the pH value

was adjusted to 7.0 ± 0.1 by addition of morpholinepropanesulfonic acid solution (MOPS; 0.165 mol.L^{-1} ; Sigma-Aldrich). The medium was filter-sterilized through 0.22μ membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). The commercial antifungal agents' evaluated were amphotericin B (AmpB) and fluconazole (FLU), both from Pfizer, New York, USA. AmpB was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and FLU was prepared in distilled water. Different concentrations of both antifungal agents were prepared and used in a range from 0.125 to $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for FLU and 0.03 to $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for AmpB.

Candida spp. was grown on SDA medium and incubated at 35°C . Suspensions of the isolate were prepared, and their densities were adjusted according to the 0.5 scale of MacFarland standard (CLSI, 2008) for 90% transmission at 530 nm through the analysis in spectrophotometer (Spectronic Genesys, Application SoftcardTM, Milton Roy). The final inoculum volume was adjusted to 5.0 mL of sterilised saline solution and was further diluted in RPMI 1640 to a concentration about 2 to $5 \times 10^3 \text{ cells.mL}^{-1}$.

For the susceptibility tests, sterilised flat-bottomed 96 well microtitre plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) were used. The inoculum was added to the wells with the tested drugs, and the plates were incubated at 25°C for two days before reading the results to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of the evaluated antifungals. The MICs for amphotericin B and fluconazole were determined to have 100% and 80% inhibition relative to that of growth controls.

The antimycotic sensitivity were determined according to the M27-A3 reference method (CLSI, 2008), based on the prior sensitivity range. Each experiment was performed in triplicate. The MIC for each antifungal drug was determined.

3. Results and Discussions

On this work was developed a strategy to compare the discriminative capability between the classical phenotypical approach, including morphological and biochemical analysis, and the new spectral method by MALDI-TOF ICMS of yeasts from clinical cases. Forty one yeast isolates from clinical cases, most of them from deep sites were firstly identified using a classical phenotypical approach (Table 1). All 41 isolates were identified by these two approaches as belonging to the genus *Candida* and distributed as follow: 20 *C. albicans*, 5 *C. krusei*, 11 *C. parapsilosis* and 5 *C. tropicalis* isolates. In order to clarify some doubt phenotypical identification about the isolates URM 4990, URM

4388, URM 4124, URM 4818, URM 4261, URM 4790 and URM 1150 VITEK 1 was used.

From the comparative analysis of the Table 1 it is possible to observe that for the classical phenotypical identification and MALDI-TOF ICMS data 11 isolates, *c.a.* 27.0% of the overall analysed microbial population, do not correspond to the same identification.

By the analysis of these data it is possible to observe that there is incongruence between the classical phenotypical approach results and the new spectral data. The isolates URM 4802, URM 4263, URM 1059, URM 934 and URM 109 were identified as been *C. krusei* by classical phenotypical analysis and as *Issatchenkia orientalis* by MALDI-TOF ICMS. A second incongruence found between the two discussed approaches is observed for the isolates URM 4261, URM 3627, URM 3624 and URM 3621. These four isolates were identified as been *C. parapsilosis* by the classical phenotypical approach. However, two of these isolates, URM 4261 and URM 3624, were identified as been *C. tropicalis* and the further two isolates, URM 3627 and URM 3621, were identified as been *C. albicans* by MALDI-TOF ICMS.

Finally, there is last incongruence between the result obtained through the two evaluated methods of identification for the isolates URM 3719 and URM 4608. The isolate URM 3719 was identified as *C. albicans* through the classical phenotypical approach and as *C. tropicalis* by MALDI-TOF ICMS. On the other hand URM 4608 was identified as *C. parapsilosis* by classical phenotypical method and unidentified by MALDI-TOF ICMS. However, even has been unidentified by MALDI-TOF ICMS it grouped separated on the new spectral dendrogram (Figure 1). Furthermore, the distinct grouping of this isolate was later confirmed by molecular biology analysis.

Additionally, one of the seven isolates analysed by VITEK 1 (URM 4261) was identified as been *C. parapsilosis* by this technique and later identified as *C. tropicalis* by MALDI-TOF ICMS. It corresponds to 14.3% of incongruence the overall population analysed by VITEK 1 and MALDI-TOF ICMS.

A representative group of eight isolates from eleven samples that presented incongruent results between these two approaches were analysed by molecular biology technique. The choice of the isolates for the molecular biology analyses was the results obtained by MALDI-TOF ICMS. For the group of isolates URM 4802, URM 4263, URM 1059, URM 934 and URM 109 that were identified as *C. krusei* by classical phenotypical analysis and as *Issatchenkia orientalis* by MALDI-TOF ICMS, were chosen to analyse

by molecular biology URM 4802 and URM 1059. These two isolates are in the border of the MALDI-TOF ICMS dendrogram grouping (Figure 1) and could give the best biological representation of the overall group.

The additional isolates evaluated by molecular biology were URM 3621 and URM 3627. These isolates were identified as *C. parapsilosis* by classical phenotypical approach. However, they were identified as *C. albicans* by MALDI-TOF ICMS and grouped together in the new spectral dendrogram (Figure 1). The molecular biology test confirmed this isolates as *C. albicans*.

The isolates URM 3621 and URM 3627 that were identified as *C. parapsilosis* by classical phenotypical approach and identified as *C. tropicalis* by MALDI-TOF ICMS technique (Figure 1). The isolate URM 3621 presents very interesting profile in the MALDI-TOF ICMS dendrogram. It is located on the border of the dendrogram, between *C. albicans* group and the *C. tropicalis* one. However, both isolates, URM 3621 and URM 3627, were also identified as *C. tropicalis* by molecular biology analysis.

The isolate URM 3719 that was identified as *C. parapsilosis* by classical phenotypical approach and was identified and grouped together as *C. tropicalis* by MALDI-TOF ICMS (Figure 1). This result was also corroborated by molecular biology analysis.

Finally, the isolate URM 4608 that was identified as *C. parapsilosis* by classical phenotypical approach was not identified by MALDI-TOF ICMS. However, this isolate does not grouped together with the *C. parapsilosis* group (Figure 1). Then, it was evaluated by molecular biology and identified by this technique as *C. haemulonii*. This information was further added to our MALDI-TOF ICMS data base and the final spectra dendrogram already presents the right species identification to this isolate.

Less than one third (26.8%) of the samples analysed by classic taxonomy disagreed of the identification performed by MALDI-TOF ICMS. The MALDI-TOF ICMS results were soundly supported by molecular biology analysis. Through these approaches two additional identifications belonging to the *Candida* and *Issatchenkia* genera were added. The former one contained one isolate of *C. haemulonii* and the later one contained five isolates of *I. orientalis*. It indicates that MALDI-TOF ICMS analysis is a powerful technique to identify yeasts from clinical cases.

Because important ribosomal proteins can be easily used as biomarkers in the MALDI-TOF ICMS the reliability of this technique is almost 100%. MALDI-TOF ICMS

is simple and fast, with partial automation technique and presents potential to discriminate closely related *Candida* species such as *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* which are feasible otherwise only by molecular biology techniques and also by Fourier Transform Infrared (Santos et al., 2010b). However, due to the immensurable number of different biological variability even inside of one single yeast species the availability of an extensive database is required. To illustrate this, MALDI-TOF ICMS was powerful enough to generate a distinctive spectrum to URM 4608 (*C. haemulonii*) separating it from the other isolates in the dendrogram, however, the database was not expert enough to coin the isolate with the right identification.

The answer time achieved by this technique is about 30 sec per sample. Since the time required for the pathogen recognition is an important determinant of infection-related mortality rates of hospitalised patients, this technique is already an important tool to get fast yeast related species identification.

The susceptibility profiles of AmpB and FLU against these isolates were also evaluated in order to provide information regarding their clinical relevance. The susceptibility profile performed in this work was validated by the use of the reference strain ATCC 22019 that have presented to AmpB MIC = 0.5 µg/mL and to FLU MIC = 8 µg/mL.

The results obtained from this assay (Table 2) show that both antifungal agents present a broad range of activity against all 41 yeast isolates analysed. A total of 92.68% and 60.98% of the strains were considered susceptible *in vitro* to AmpB and to FLU since they presented a MIC ≤ 1 µg/mL and MIC ≤ 8 µg/mL, respectively. In contrast, 21,95% of strains were resistant to FLU presenting MIC ≥ 64 µg/mL.

Overall, the 41 yeast isolates were much more susceptible to AmpB then to FLU. Moreover, from all yeast isolates evaluated in this study *I. orientalis* was the group that showed the highest resistance to both antifungal agents. This tendency was followed by *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates. It is also clear that in some cases strains with long term preservation have showed higher resistance to the antifungal agents than others recently preserved. *C. albicans* URM 3716 after 10 years shows the highest AmpB MIC (1 mg/mL) and *I. orientalis* for FLU MICs shows variable pattern (16 and 64 mg/mL) over 52 years of preservation. This suggests that the resistance trait in these species is much more strain-specific than influenced by the preservation time.

In conclusion, classical phenotypical approach including VITEK techniques are very important in the daily routine analyses in health centres and hospitals. However, it is always associated to a high degree of misidentifications (Lockhart et al. 2008, Marklein et al., 2009, Putignani et al., 2010) and it should be supported by a fast, reliable and accurate approach such as MALDI-TOF ICMS. In this way, MALDI-TOF ICMS is a potential candidate to add value to the classical phenotypical approach for the clinical yeast identifications.

Acknowledgements

Research leading to these results received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7, 2007e2013), Research Infrastructures Action, under grant agreement No. FP7-228310 (EMbaRC project) and Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES/Brazil). The authors thank to URM Culture Collection, UFPE, Brazil, for donation of clinical isolates used in this study.

References

- Cendejas-Bueno, E., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, R.L., Cuenca-Estrella, M. (2010) Identification of Pathogenic Rare Yeast Species in Clinical Samples: Comparison between Phenotypical and Molecular Methods. *J. Clin Microbiol* 48, 1895-1899.
- CLSI, 2008: Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA.
- Correia, A., Sampaio, P., James, S., Pais, C. (2006) *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 313–317.
- Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.M., Manfait, M., Sockalingum, G.D. (2005) Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 239-247.
- Holland, R.D., Wilkes, R.D., Ralli, F., Sutherland, R.D., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, Jr.J.O. (1996) Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral

- Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10, 1227-1232.
- Latouche, G.N., Daniel, H.M. Lee, O.C., Mitchell, T.G., Sorrell, T.C., Comparison, W.M. (1997) Comparison of Use of Phenotypic and Genotypic Characteristics for Identification of Species of the Anamorph Genus *Candida* and Related Teleomorph Yeast Species. *J Clin Microbiol*, 35, 3171-3180.
- Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P., Chang, T.C. (2006) Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *J Clin Microbiol*, 44, 693-699.
- Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2008) *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol*, 46, 374-376.
- Marinach-Patrice, C., Fekkar, A., Atanasova, R., Gomes, J., Djamdjian, L., Brossas, J.Y., Meyer, I., Buffet, P., Snounou, G., Datry, A., Hennequin, C., Golmard, J.L., Mazier, D. (2010) Rapid Species Diagnosis for Invasive Candidiasis Using Mass Spectrometry. *PLoS ONE*, 5, 1-5.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horré, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.-G. (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47, 2912-2917.
- Medrano, D.J.A., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Rocha, M.F.G., Rabenhorst, S.H.B., Sidrim, J.J.C. (2006) Candidemia in A Brazilian Hospital: The Importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*, 48 17-20.
- Mozina, S.S., Raspor, P., (1997) Molecular Techniques for Food Identification in Food Processing. *Food Technol Biotechnol*, 35, 55-61.
- Putignani, L., Del Chierico, F., Onori, M., Mancinelli, L., Argentieri, M., Bernaschi, P., Coltella, L., Lucignano, B., Pansani, L., Ranno, S., Russo, C., Urbani, A., Federicibd, G., Menichella, D. (2010) MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol. BioSyst. Online publication, DOI: 10.1039/C0MB00138D*.
- Qian, J., Cutler, J.E., Cole, R.B., Cai, Y. (2008) MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal Bioanal Chem* 392, 439-449.

- Santos, C., Paterson, R.M.R., Venâncio, A., Lima, N. (2010a) Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 108, 375–385.
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010b) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterisation of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161, 168-175.
- Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E., Coleman, D.C. (1995) *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol* 141, 1507–1521.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A.R., Maiden, M.C.J., Odds, F. C. (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43, 284–292.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, E.J. (2010) High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin Microbiol*, 48, 900-907.
- White, T.J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a Guide for Methods and Applications*. Pp 315-322. Ed by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. Taylor. New York, Academic Press.

Table 1: Species identification of clinical yeast isolates. The framed isolates present a discordant identification through the classical phenotypic tests and MALDI-TOF ICMS analysis.

Strain number (URM)	Preservation (years)	Classical Phenotypic ID	New Spectral ID by MALDI-TOF ICMS	Substratum
4990	01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Vaginal secretion
4987	01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Vaginal secretion
4986	01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Vaginal secretion
4820	02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Ungual scrap
4819	02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Ungual scrap
4817	02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Ungual scrap
4609	03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Blood
4606	03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Blood
4388	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
4387	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
4386	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
4385	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
4384	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
4260	05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
4127	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Inguinal area
4126	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Urine
4125	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Spittle
4124	07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Oropharyngeal secretion
3719	10	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	Tooth scrap
3716	10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Tooth scrap
4802	02	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Unknown
4263	05	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Oropharyngeal secretion
1059	48	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Unknown
934	49	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Appendix biopsy
109	52	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Unknown
4984	01	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Vaginal secretion
4970	01	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Vaginal secretion
4889	02	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Blood
4818	02	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Ungual scrap
4804	02	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	IFM
4608	03	<i>C. parapsilosis</i>	<i>unidentified</i>	Blood
4607	03	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Blood
4261	05	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Oropharyngeal secretion
3627	12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	Spittle
3624	12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Spittle
3621	12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	Spittle
4790	02	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Cassava powdery
4262	06	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Oropharyngeal secretion
1150	46	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Tongue
933	49	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Vaginal secretion
916	49	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Feces

* Unidentified substratum

Table 2: AmpB and FLU MICs for clinical yeast isolates.

Strain number (URM)	Preservation (years)	Strains ID	MICs (µg/mL)	
			AmpB	FLU
4990	01	<i>C. albicans</i>	0.25	>64
4987	01	<i>C. albicans</i>	0.25	16
4986	01	<i>C. albicans</i>	0.25	16
4820	02	<i>C. albicans</i>	0.5	4
4819	02	<i>C. albicans</i>	0.5	4
4817	02	<i>C. albicans</i>	0.5	4
4609	03	<i>C. albicans</i>	0.5	4
4606	03	<i>C. albicans</i>	0.25	2
4388	05	<i>C. albicans</i>	0.25	>64
4387	05	<i>C. albicans</i>	0.125	2
4386	05	<i>C. albicans</i>	0.25	1
4385	05	<i>C. albicans</i>	0.25	2
4384	05	<i>C. albicans</i>	0.06	2
4260	05	<i>C. albicans</i>	0.06	2
4127	07	<i>C. albicans</i>	0.25	0.5
4126	07	<i>C. albicans</i>	0.125	0.5
4125	07	<i>C. albicans</i>	0.06	0.5
4124	07	<i>C. albicans</i>	0.25	>64
3719	10	<i>C. tropicalis</i>	2	64
3716	10	<i>C. albicans</i>	1	0.5
4802	02	<i>I. orientalis</i>	2	64
4263	05	<i>I. orientalis</i>	0.125	64
1059	48	<i>I. orientalis</i>	0.125	16
934	49	<i>I. orientalis</i>	2	64
109	52	<i>I. orientalis</i>	0.5	16
22019 ^a	-	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	8
4984	01	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	16
4970	01	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	16
4889	02	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	2
4818	02	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	4
4804	02	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	8
4608	03	<i>C. haemulonii</i>	1	16
4607	03	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	4
4261	05	<i>C. tropicalis</i>	0.125	>64
3627	12	<i>C. albicans</i>	0.06	0.5
3624	12	<i>C. tropicalis</i>	0.06	0.5
3621	12	<i>C. albicans</i>	0.06	0.5
4790	02	<i>C. tropicalis</i>	1	32
4262	06	<i>C. tropicalis</i>	0.5	4
1150	46	<i>C. tropicalis</i>	0.25	>64
933	49	<i>C. tropicalis</i>	0.125	4
916	49	<i>C. tropicalis</i>	0.125	4

^a ATCC strain.

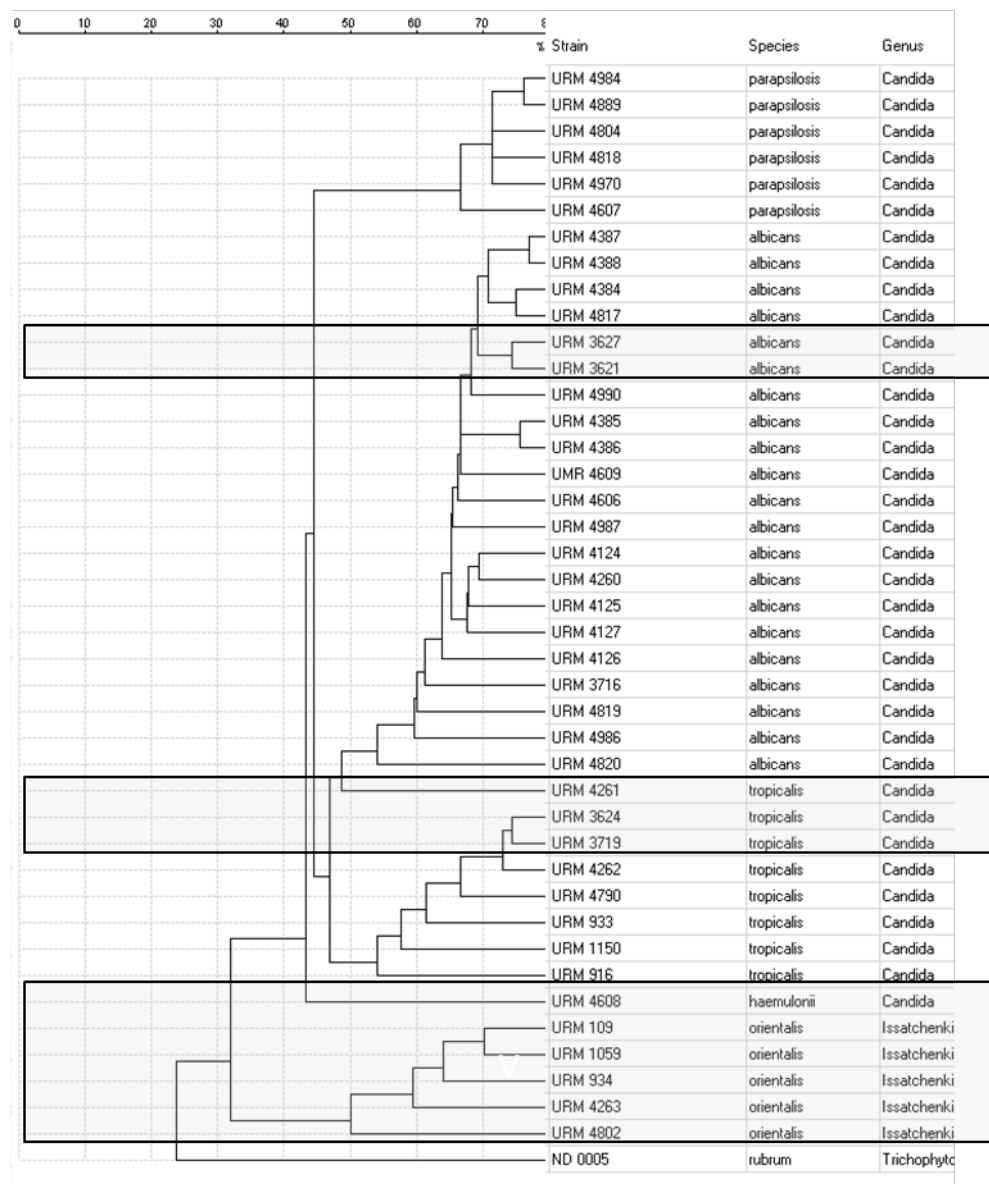


Figure 1: Spectra based dendrogram of yeast isolates evaluated in this work. The framed isolates are those that presented different identification through the classical phenotypic and MALDI-TOF ICMS analyses. The dendrogram shows the final identification based on the polyphasic approach used in this work: classical phenotypical, new spectral by MALDI-TOF ICMS and ITS sequencing.. *Trichophyton rubrum* was used as outgroup.