



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

IANCA KARINE PRUDENCIO DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE HÍBRIDOS DE 2-ISOXAZOLINA
AZABICÍCLICA E SUA INTERAÇÃO COM FLUCONAZOL**

Recife

2019

IANCA KARINE PRUDENCIO DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE HÍBRIDOS DE 2-ISOXAZOLINA
AZABICÍCLICA E SUA INTERAÇÃO COM FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Albuquerque, Ianca Karine Prudencio de
Avaliação da atividade anti-*Candida* de híbridos de 2-isoxazolina
azabícclica e sua interação com fluconazol / Ianca Karine Prudencio
de Albuquerque - 2019.
45 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão
Coorientadora: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de
Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Candidíase 2. Antifúngico 3. Compostos híbridos
I. Gusmão, Norma Buarque de (orient.) II. Macêdo, Danielle Patrícia
Cerqueira (coorient.) III. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-198

IANCA KARINE PRUDENCIO DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE HÍBRIDOS DE 2-ISOXAZOLINA
AZABICÍCLICA E SUA INTERAÇÃO COM FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovado em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves Neto (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rejane Pereira Neves (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Carolina Maria da Silva (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação aos amores da minha vida: a minha família, em especial aos meus avós Maria Madalena, Pedro Prudencio, Alvany Dias e Algacir Albuquerque (*in memorian*), a minha bisavó Alzira Leite (*in memorian*), aos meus amigos e animais de estimação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, mestre supremo deste e de outros universos.

Aos que compõem a Universidade Federal de Pernambuco, pessoas estas, que me acolheram durante minha formação acadêmica e me proporcionaram momentos inesquecíveis.

Ao Departamento de Micologia, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, por todo o auxílio científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - pelo apoio financeiro.

À minha querida orientadora, Dra. Norma Gusmão, por todos os ensinamentos transmitidos, sejam estes científicos ou não, pela paciência e, principalmente, pela confiança depositada a mim.

À minha amada coorientadora, Dra. Danielle Macêdo, pelos momentos compartilhados, pela confiança, paciência e acima de tudo por nunca desistir de mim, sendo meu ponto de equilíbrio em diversos momentos.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas por toda infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho, mais precisamente aos membros do Laboratório de Análises Microbiológicas e Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos, em especial, à Laís Vieira e Felipe Coutinho, pela ajuda incansável na realização dos experimentos e pela amizade.

Aos membros da banca, pela disponibilidade para avaliação deste trabalho e pelos conselhos para a conclusão deste, da melhor forma possível.

À Alexandra Elbakyan, fundadora do Sci-Hub por fornecer acesso livre as mais diferentes publicações científicas.

Aos meus amigos, meus “Unicórnios Coloridos”, e a Igor Dias pela jornada acadêmica e pessoal.

E a todos que contribuíram de maneira indireta, possibilitando que isto tudo fosse possível.

RESUMO

A candidíase é a infecção fúngica oportunista mais prevalente e têm como agentes etiológicos, espécies pertencentes ao gênero *Candida*. Em decorrência de diversos fatores, os isolados de *Candida* spp. se tornam resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento dos casos de candidíase. Portanto, estudos que buscam novos compostos naturais ou sintéticos são importantes para suprir a lacuna criada pela resistência celular e, conseqüentemente, uma possível alternativa medicamentosa. A hibridização molecular é um método para a obtenção de compostos sintéticos que tem como princípio a união de dois ou mais grupos farmacofóricos em uma única molécula. Neste contexto, o presente estudo visa avaliar três compostos híbridos de 2-isoxazolina azabicíclica com tiazolidina-2,4-diona e com tiossemicarbazona quanto a sua atividade anti-*Candida* e quanto à interação com o fluconazol. Ao todo, foram testados pela técnica de difusão em disco de papel (M44-A2 – CLSI) 20 isolados clínicos de *Candida* spp. e pelas técnicas de microdiluição em caldo (M27-S4 – CLSI) e *checkerboard* (tabuleiro de xadrez) 10 isolados clínicos de *Candida* spp. Ao final dos testes, nenhum dos compostos híbridos inibiu o crescimento de células planctônicas dos isolados de *Candida* spp. nas diferentes técnicas e nas concentrações testadas. Contudo, quando combinados ao fluconazol dois híbridos de 2-isoxazolina azabicíclica e tiossemicarbazona exerceram efeito sinérgico apresentando Índice de Concentração Inibitória Fracionária – FICI – menor que 0,5 (0,27294 e 0,26513) frente a *Candida albicans* URM 4990. Por apresentarem sinergismos ao serem combinados com o fluconazol há a necessidade da realização de mais testes *in vitro* e *in vivo* para determinar se em diferentes isolados dessa espécie, tal interação permanece e se é possível utilizá-la em casos com resistência ao fluconazol comprovada.

Palavras-chave: Sinergismo. Antagonismo. Antifúngico. *Checkerboard*. 2-isoxazolina azabicíclica.

ABSTRACT

Candidiasis is the most prevalent opportunistic fungal infection and have as etiological agents, species belonging to the genus *Candida*. Due to several factors, the isolates of *Candida* spp. become resistant to the drugs used to treat cases of candidiasis. Therefore, studies that look for new natural or synthetic compounds are important to fill the gap created by cell resistance, and thus a possible drug alternative. Molecular hybridization is a method for the preparation of synthetic compounds having as a principle the joining of two or more pharmacophoric groups into a single molecule. In this context, the present study aims to evaluate three hybrid compounds of azabicyclic 2-isoxazoline with thiazolidine-2,4-dione and with thiosemicarbazone for its anti-*Candida* activity and for its interaction with fluconazole. In all, 20 clinical isolates of *Candida* spp. were tested by the paper disc diffusion technique (M44-A2 - CLSI) and broth microdilution techniques (M27-S4 - CLSI) and checkerboard (clinical chess) 10 clinical isolates of *Candida* spp. At the end of the tests, none of the hybrid compounds inhibited the planktonic cell growth of *Candida* spp. in the different techniques and concentrations tested. However, when combined with fluconazole, two hybrids of azabicyclic 2-isoxazoline and thiosemicarbazone had a synergistic effect with Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI - less than 0.5 (0.27294 and 0.266513) compared to *Candida albicans* URM 4990. Synergism when combined with fluconazole, there is a need for more in vitro and in vivo tests to determine if this interaction remains in different isolates of this species and if it is possible to use it in cases with proven resistance to fluconazole.

Keywords: Synergism. Antagonism. Antifungal. Checkerboard. Aza-bicyclic 2-isoxazoline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da estrutura química da anfotericina B.....	15
Figura 2 -	Representação da estrutura química da caspofungina.....	16
Figura 3 -	Representação da estrutura química do fluconazol.....	16
Figura 4 -	Representação da estrutura química da flucitosina.....	17
Figura 5 -	Ilustração dos principais alvos antifúngicos, mecanismos de resistência fúngica e abordagens de resistência fúngica.....	19
Figura 6 -	Representação da estrutura química do núcleo de isoxazolina.....	20
Figura 7 -	Representação da estrutura geral de tiazolidinadiona.....	21
Figura 8 -	Representação da estrutura geral de tiossemicarbazona.....	21
Figura 9 -	Representação das estruturas químicas dos compostos híbridos de 2-isoxazolina abicíclica utilizado nos testes para a verificação de atividade antifúngica.....	22
Figura 10 -	Desenho esquemático da colocação dos fármacos na placa de microtitulação para o teste do <i>checkerboard</i>	26
Figura 11 -	Representação do método de leitura proposto por Den Hollander <i>et al.</i> (1998) onde cada linha tem seu poço de inibição indicado na técnica do <i>checkerboard</i>	27
Figura 12 -	Teste de difusão em disco, após 24h de crescimento, para a observação do crescimento dos isolados de <i>Candida albicans</i> pelo híbrido AN-02.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Informações sobre os isolados fornecidos pela Coleção de culturas URM (UFPE) e que foram utilizados nos testes qualitativos para a prospecção da atividade antifúngica dos compostos híbridos.....	23
Tabela 2 -	Isolados de clínicos de <i>Candida</i> spp. utilizados nos testes quantitativos para a prospecção da atividade antifúngica dos compostos híbridos.....	24
Tabela 3 -	Resultados dos testes de microdiluição em caldo.....	29
Tabela 4 -	Resultados dos testes de interação sinérgica a partir da técnica do <i>checkerboard</i> dos híbridos de 2-isoxazolina azabicíclica frente a <i>Candida</i> spp., por meio da interpretação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária - FICI.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FCZ	Fluconazol
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Meio de cultura Instituto Roswell Park Memorial
DAS	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFC	Unidade Formadora de Colônia
URM	<i>University Recife Mycologia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1	CANDIDÍASE.....	13
2.1.1	Definições e características.....	13
2.1.2	Espécies de <i>Candida</i> envolvidas em casos de candidíase.....	14
2.1.3	Classes antifúngicas e mecanismos de ação.....	15
2.1.3.1	Polienos.....	15
2.1.3.2	Equinocandinas.....	15
2.1.3.3	Azóis.....	16
2.1.3.4	Flucitosina.....	17
2.1.4	Resistência fúngica.....	18
2.2	HÍBRIDOS MOLECULARES.....	20
2.2.1	Hibridização molecular.....	20
2.2.2	Isoxazolina.....	20
2.2.3	Tiazolidinadiona.....	21
2.2.4	Tiossemicarbazona.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	HÍBRIDOS MOLECULARES.....	22
3.2	TESTE QUALITATIVO PARA PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	22
3.3	TESTE QUANTITATIVO PARA PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	24
3.4	TESTE DE INTERAÇÃO HÍBRIDO/FLUCONAZOL PARA PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA - <i>CHECKERBOARD</i> - TABULEIRO DE XADREZ	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	28
4.2	INTERAÇÃO COMPOSTO/FLUCONAZOL FRENTE A <i>Candida</i> spp.....	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	APÊNDICE A - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (AN-02).....	41
	APÊNDICE B - CÁLCULOS PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONÁRIA – FICL.....	43

1 INTRODUÇÃO

As micoses oportunistas são causadas por fungos que, normalmente, não são considerados patogênicos, mas que por um desequilíbrio da microbiota normal ou da imunidade do hospedeiro possibilita a expressão de fatores de virulência, ocasionando a invasão e a propagação fúngica com posterior lesão ao hospedeiro. A mais comum entre tais micoses é a candidíase, esta é causada por diferentes espécies de *Candida* (Sidrim e Rocha, 2004; Kauffman, 2005).

Mais de 200 espécies de *Candida* são conhecidas, contudo apenas cerca de 10% são prejudiciais à saúde humana, dentre estas a predominantemente isolada é *Candida albicans*, entretanto infecções por *Candida* não-*C. albicans* tem se tornado frequente, principalmente por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. auris* (Colombo e Guimarães, 2003; Celebi *et al.*, 2008; Dalazen *et al.*, 2011; Pedroso *et al.*, 2014; Althaus *et al.*, 2015; Özer, Durmaz e Yula, 2016; Welsh *et al.*, 2017; Sadeghi *et al.*, 2018).

Por outro lado, a incidência de isolados clínicos resistentes a fármacos vem se tornando frequente, por conta disso se faz necessária a mudança do esquema terapêutico usual, estimulando assim a utilização de drogas não rotineiras que podem resultar no surgimento de novas resistências. Tal cenário, acarreta a busca por novos compostos com atividade anti-*Candida* spp. para suprir as possíveis lacunas medicamentosas (Celebi *et al.*, 2008; Dalazen *et al.*, 2011; Althaus *et al.*, 2015).

Uma possibilidade, é a síntese de fármacos com mais de um grupo farmacofórico por meio do método de hibridização molecular, estes podem possuir propriedades farmacológicas distintas ou não, originando moléculas híbridas novas ou melhoramento dos medicamentos já existentes. Contudo essas novas moléculas, após sintetizadas, podem apresentar atividade farmacológica diferente do original ou do efeito esperado, ou, em alguns casos, nenhuma ação final (Arroio, Honório e Silva, 2010).

Compostos que possuam o núcleo isoxazolina em sua estrutura apresentaram, em pesquisas, por exemplo, atividade anticancerígena (Kamal *et al.*, 2011; Lingaraju *et al.*, 2018), antimicrobiana (Mandawad *et al.*, 2014; Nikam *et al.*, 2015; Prajapati *et al.*, 2015), antiinflamatória e analgésica (Chavan e Khadke, 2012), antioxidante (Kallitsakis *et al.*, 2017).

Diante do indício de diferentes atividades de tal núcleo em estrutura híbrida, o presente estudo tem por objetivo testar a atividade antifúngica de híbridos de 2-isoxazolina azabicíclica frente a isolados de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, além da interação dos compostos híbridos com o fluconazol.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CANDIDÍASE

2.1.1 Definições e características

As micoses oportunistas são um grupo de infecções causadas por fungos que normalmente não são considerados patogênicos, mas que com o desequilíbrio da microbiota normal ou a baixa da imunidade do hospedeiro começam a expressar fatores de virulência que por consequência os torna infeccioso, como exemplos deste tipo de infecção temos a aspergilose, a fusariose e a candidíase. A candidíase ou candidose é considerada a mais comum e tem como agente etiológico espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Candida* (Sidrim e Rocha, 2004; Colombo *et al.*, 2013).

O gênero *Candida*, pertence taxonomicamente no Filo Ascomycota, compreende cerca de 200 espécies, destas, cerca de 10% são prejudiciais à saúde humana. Das infecções por *Candida* sp. cerca de 50 a 65% são causadas pela espécie *C. albicans*, as demais são causadas por espécies não-*C. albicans*, entre elas estão incluídas *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. auris* e complexo *C. parapsilosis* (Calderone, 2002; Barbedo e Sgarbi, 2010; Colombo *et al.*, 2013; Ericsson *et al.*, 2013; Shigemura *et al.*, 2014; Bitew e Abebaw, 2018).

Determinadas características destas leveduras apresentam alta patogenicidade e causam prejuízos a saúde do ser humano, por exemplo, estas podem crescer a 37 °C, produzem metabólitos que geram manifestações alérgicas imediatamente ou tardiamente, produzem enzimas (lipases e proteases, como exemplo), conseguem se aderir às células do hospedeiro e outras formam estruturas filamentosas, hifas e pseudohifas, que podem representar uma barreira a mais para o sistema imune, além de conseguirem modular o sistema imune do hospedeiro (Sidrim e Rocha, 2004; Barbedo e Sgarbi, 2010; Sobel, 2014).

Algumas espécies de *Candida* compõem a microbiota humana, sendo presente na mucosa oral, na pele, no trato respiratório superior, no intestino grosso, no ouvido externo, na uretra anterior e na genitália externa de indivíduos saudáveis (Sidrim e Rocha, 2004; Barbedo e Sgarbi, 2010; Rizzetto, De Filippo e Cavalieri, 2015).

A candidíase se manifesta clinicamente de diferentes formas e em diferentes locais, acometendo frequentemente a mucosa oral, vaginal e esofágica, sendo desde lesões mais superficiais a lesões invasivas ou disseminadas, além de ser classificada como uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST) (Sidrim e Rocha, 2004; OMS, 2005; Barbedo e Sgarbi, 2010; Sobel, 2014).

2.1.2 Espécies de *Candida* envolvidas em casos de candidíase

Diferentes espécies de *Candida* são responsáveis pela infecção conhecida como candidíase, a mais prevalente é *Candida albicans*. Alguns fatores intrínsecos de *C. albicans* garantem uma maior patogenicidade e conseqüentemente um elevado poder de invasão quando comparadas as outras espécies, justificando, de certa forma, que a maioria dos casos sejam associados a ela. São exemplos dessas características, a formação de tubo germinativo, formação de biofilme, o polimorfismo celular que é resultante da mudança de temperatura e pH do meio, a secreção de inúmeras substâncias, como adesinas, invasinas, proteases e fosfolipases, além da facilidade de interação com as células epiteliais ao se considerar a adesão, invasão e dano celular (Sidrim e Rocha, 2004; Barbedo e Sgarbi, 2010).

Candida glabrata não apresenta a capacidade de formação de tubo germinativo, hifas ou pseudo-hifas, tais estruturas garantem uma elevada invasão tecidual. Contudo, esta espécie pode formar biofilme e é frequentemente relatada em episódios de candidemia, candidúria e candidíase vulvovaginal. Algumas pesquisas relatam a presença de resistência intrínseca aos antifúngicos azólicos (Bennett, Izumikawa e Marr, 2004; Ahmad e Khan, 2009; Barbedo e Sgarbi, 2010; Ericsson *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2016).

Candida guilliermondii é uma levedura haploide e comensal humana, e é considerada uma espécie emergente no gênero *Candida*. Está envolvido em diversos tipos de candidíase, entre eles casos de candidúria, candidemia e candidíase vulvovaginal, podendo apresentar problemas no tratamento por conta da diminuição da sensibilidade a alguns antifúngicos (Bennett, Izumikawa e Marr, 2004; Ahmad e Khan, 2009; Barbedo e Sgarbi, 2010; Ericsson *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2016).

O complexo *C. parapsilosis* é formado por três espécies *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, com diferenciação possível apenas através de técnicas de biologia molecular e espectrometria de massas. Estas espécies não possuem a habilidade de formação de tubo germinativo, podendo formar pseudo-hifas. Possui a capacidade de se aderir em superfícies abióticas, de secretar enzimas que aumentam sua virulência (Barbedo e Sgarbi, 2010; Menezes *et al.*, 2012).

Candida krusei apresenta, microscopicamente, células em formato alongado que não formam tubo germinativo, mas há a formação de pseudo-hifas. Possui resistência intrínseca ao fluconazol e uma baixa sensibilidade a anfotericina B e 5-fluorocitosina. Já *Candida tropicalis* forma pseudo-hifas longas, ramificadas, com a presença de blastoconídios agrupados. Sua presença está associada a infecções e frequentemente é sensível à fármacos poliênicos e azólicos. Porém apresenta, geralmente, uma resistência a 5-fluorocitosina (Sidrim e Rocha, 2004; Barbedo e Sgarbi, 2010).

Atualmente, relatos de infecções por *C. auris* têm sido frequentes, esta espécie foi reportada pela primeira vez por Satoh *et al.* (2009), após ser isolada do canal auditivo de um paciente internado

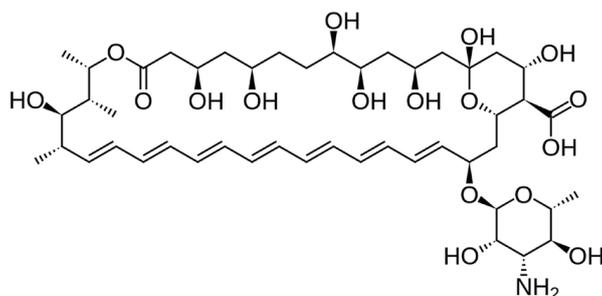
em um hospital japonês. Essas infecções têm caráter multirresistentes aos antifúngicos (azóis, equinocandinas e polienos) e, normalmente, são de difícil identificação, uma vez que pode ser identificada como outra espécie erroneamente. Até o momento, casos de infecções por *C. auris* já foram relatadas em mais de 20 países (Welsh *et al.*, 2017; CDC, 2018).

2.1.3 Classes antifúngicas e mecanismos de ação

2.1.3.1 Polienos

Essa classe de fármacos é caracterizada quimicamente pela existência de átomos de carbono ligados por numerosas ligações duplas, sendo muitos deles conjugados. Fazem parte deste grupo os seguintes fármacos: nistatina, natamicina, anfotericina B, filipina, partricina e outros. Entretanto apenas a nistatina e anfotericina B é utilizado rotineiramente na clínica médica (Constant *et al.*, 2013).

Figura 1 - Representação da estrutura química da anfotericina B.

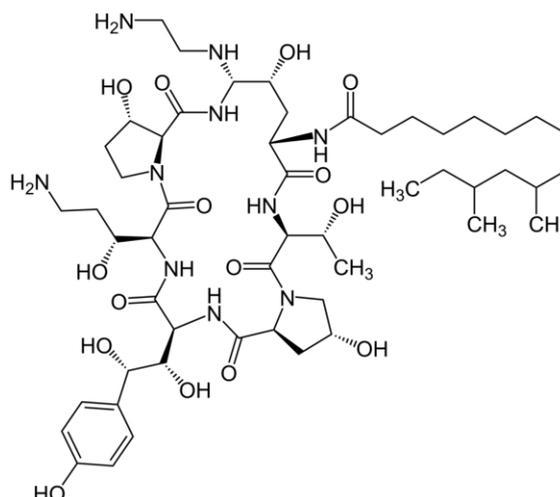


Eles interagem na membrana celular fúngica se ligando ao ergosterol, que conseqüentemente ocorre uma alteração que dá origem a um poro que altera a permeabilidade da membrana, a perda de compostos citoplasmáticos ocasionando a morte celular (Ghannoum e Rice, 1999; Diomedi, 2004; Cowen, 2008; Lewis, 2011).

2.1.3.2 Equinocandinas

As equinocandinas são consideradas uma nova classe de antifúngico. São lipopeptídeos que foram modificados sinteticamente, sendo originalmente derivados da fermentação de caldos de diversos fungos. São exemplos dessa classe a caspofungina (figura 2), micafungina e anidulafungina (Constant *et al.*, 2013).

Figura 2 - Representação da estrutura química da caspofungina.



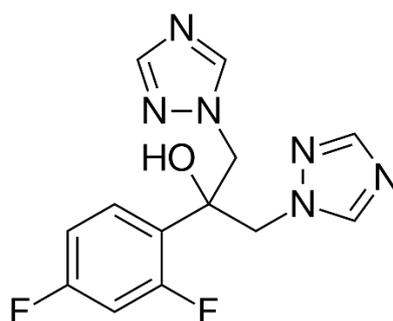
Esses fármacos atuam através da inibição do complexo de enzimas β -1,3-glicanas sintases, tais enzimas atuam na formação da parede celular, o que resulta em uma parede celular frágil, uma instabilidade osmótica, o que propicia a lise da célula. Possuem um amplo espectro de ação frente a diferentes fungos, além de, em alguns casos, um efeito aditivo quando utilizado com outros fármacos (Diomedi, 2004; Cowen, 2008; Chen e Sorrell, 2011; Lewis, 2011).

2.1.3.3 Azóis

Os azóis são caracterizados quimicamente pela presença do grupamento azol e são produzidos através da síntese química. Diversos fármacos fazem parte dessa classe, como exemplo temos o fluconazol, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol, voriconazol e posaconazol (Constant *et al.*, 2013).

Dentre os azóis, os antifúngicos triazóis e imidazóis são utilizados rotineiramente no tratamento da candidíase. O mais comumente empregado é o fluconazol (figura 3), possui em sua estrutura dois grupamentos triazóis, podendo ser incluído no tratamento das diferentes manifestações da candidíase com administração oral, tópica ou intravenosa.

Figura 3 - Representação da estrutura química do fluconazol.

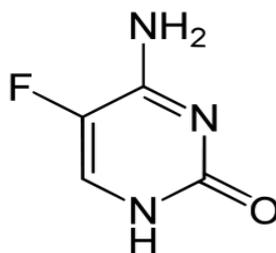


Nos fungos, sua ação se dá pela inibição de uma enzima do complexo citocromo P450, a lanosterol 14 α -demetilase, responsável pela síntese do ergosterol da membrana celular, o que resulta em uma membrana celular defeituosa que favorece a perda da permeabilidade seletiva, ocasionando a morte celular (Diomedi, 2004; Ghannoum e Rice, 1999; Cowen, 2008).

2.1.3.4 Flucitosina

A flucitosina (figura 4) é considerada um pró-fármaco, uma vez que há a conversão ao fármaco dentro da célula fúngica por inibição da desaminação da flucitosina em 5-fluorouracil. A 5-fluorouracil, por sua vez, é um potente inibidor da timidilato sintase que interfere, consequentemente na síntese do DNA e RNA fúngico e na divisão celular. Este, normalmente, é utilizado em associação com a anfotericina B ou fluconazol, afinal quando é usado sozinho se observa um crescimento no desenvolvimento de mecanismos de resistência ao fármaco (Diomedi, 2004; Carillo-Muñoz *et al.*, 2006).

Figura 4 - Representação da estrutura química da flucitosina.



2.1.4 Resistência fúngica

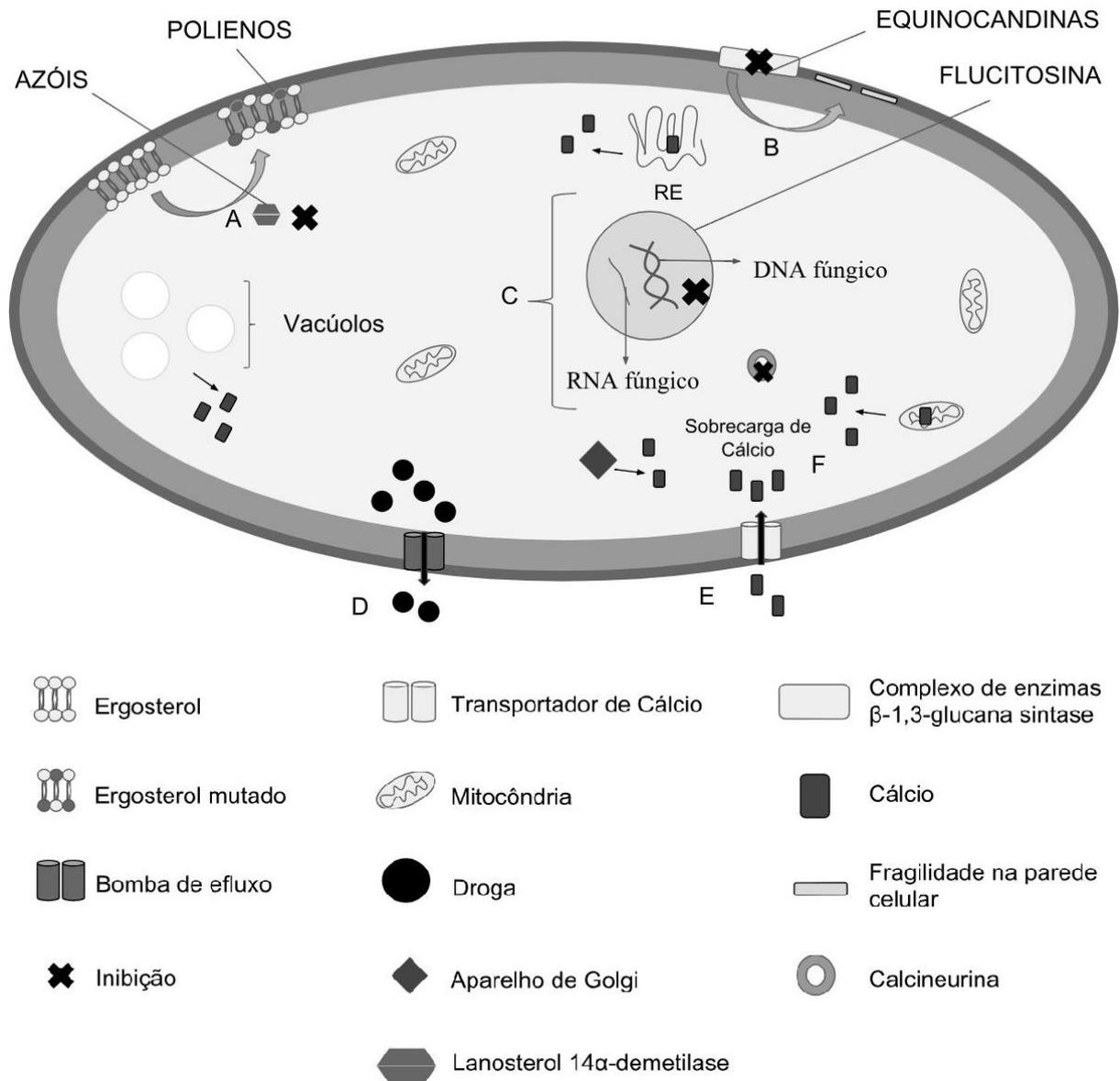
A resistência está ligada a evolução dos microrganismos, uma vez, que apenas as células que consigam sobreviver nas mais diversas condições e conseguem se reproduzir, perpetuam sua espécie. Entretanto, tal característica em um fungo patogênico pode trazer prejuízos à saúde humana, uma vez que o tratamento normalmente empregado para cessar a infecção não funcionará como o esperado (Sidrim e Rocha, 2004; Arthington-Skaggs e Rex, 2008, Vieira e dos Santos, 2017)

São diversas as maneiras de uma célula fúngica se tornar resistente a um determinado fármaco, tais características podem ser intrínsecas a espécie, ou seja, é uma característica genética daquele grupo de fungos, como por exemplo, a resistência da espécie *C. krusei* em relação ao fluconazol, ou podem ser adquiridas, que pode ocorrer pela exposição prévia ao fármaco, ocasionando determinadas mutações e uma posterior seleção de linhagem das células fúngicas expostas (Sidrim e Rocha, 2004; Arthington-Skaggs e Rex, 2008, Vieira e dos Santos, 2017).

A mutação no gene FKS, como observado por Perlin (2007) e Alexander *et al.* (2013), pode favorecer aos isolados de *Candida* spp. um aumento na CIM de equinocandinas e quando comparada com isolados da mesma espécie sem essa alteração. Além da mutação do gene ERG11 que em *Candida albicans*, podem estar relacionadas com a resistência ao fluconazol e a de ERG2 a anfotericina B, relatada por Jensen *et al.* (2015).

Alterações na composição da célula fúngica também são vistas como mecanismos que ocasionam a resistência (figura 5), um exemplo disso é o aumento de esfingolipídeos na membrana, podendo afetar o funcionamento de bombas de efluxo e a quantidade de ergosterol, onde por consequência pode modificar os sítios de ligação de diferentes antifúngicos (Linares *et al.*, 2013).

Figura 5 - Ilustração dos principais alvos antifúngicos, mecanismos de resistência fúngica e abordagens de resistência fúngica.



Legenda: A - representa a via de síntese do ergosterol e os mecanismos relacionados: quando há a ligação da droga com o ergosterol gera uma mudança na permeabilidade da membrana, ocasionando a morte celular; a resistência se dá pela mutação no gene que codifica o ergosterol; B - representa o mecanismo de ação de drogas que inibem o complexo de enzimas β-1,3-glucana sintase, resultando em uma parede celular frágil; C - representa o mecanismo de ação de fármacos que interagem com o DNA e RNA fúngico, dificultando assim a divisão celular; D - F representam as abordagens de resistência a antifúngicos de drogas isoladas ou em combinação: (D) modificações na bomba de efluxo de drogas, (E) sobrecarga de cálcio, inibição da calcineurina. RE, retículo endoplasmático.

Adaptado de Liu *et al.*, 2014.

2.2 HÍBRIDOS MOLECULARES

2.2.1 Hibridização molecular

Viegas-Junior *et al.* (2007) definem a hibridização molecular da seguinte maneira:

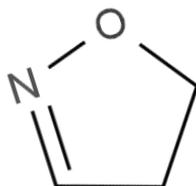
É uma estratégia de racional concepção de novos ligantes ou protótipos baseados no reconhecimento de subunidades farmacofóricas na estrutura molecular de duas ou derivados bioativos mais conhecidos que, através do adequado fusão destas subunidades, levou ao desenho de novas arquiteturas híbridas que mantêm características pré-selecionadas dos modelos originais.

Em outras palavras, é uma técnica que consiste na junção de um ou mais grupos farmacofóricos em uma única molécula, onde estas, juntas, podem gerar um efeito farmacológico distinto do inicial - considerando os grupos atuando sozinhos - ou visando potencializar os mesmos, estando inserida na Química Medicinal (Arroio, Honório e Silva, 2010).

2.2.2 Isoxazolina

Isoxazolina é um núcleo heterocíclico que contém nitrogênio e oxigênio (figura 6), pertencente a classe dos azóis com grande importância na química medicinal.

Figura 6 - Representação da estrutura química do núcleo de isoxazolina.

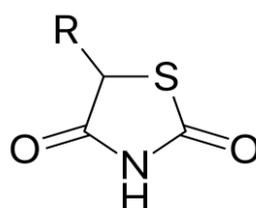


Compostos híbridos que contêm o núcleo de isoxazolina em sua estrutura têm atividades biológicas das mais variadas. Algumas dessas atividades já são relatadas na literatura, como a atividade anticancerígena (Kamal *et al.* 2011; Lingaraju *et al.*, 2018), antibacteriana (Mondal *et al.*, 2012; Picconi *et al.*, 2017; Zghab *et al.*, 2017), antifúngica - anti-*Candida albicans* (Sharma *et al.*, 2009; Nikam *et al.*, 2015; Prajapti *et al.*, 2015), anti-*Mycobacterium* sp. (Tangallapally *et al.*, 2007; Mandawad *et al.*, 2014), anti-*Aspergillus niger* (Nikam *et al.*, 2015) - antiinflamatória e analgésica (Chavan e Khadke, 2012; Mondal *et al.*, 2012), antioxidante (Kallitsakis *et al.*, 2017), anti-helmíntica (Mondal *et al.*, 2012), antimalárica (Kumar *et al.*, 2015) e anticoagulante (Zghab *et al.*, 2017).

2.2.3 Tiazolidinadiona

Tiazolidinadiona é representado por um anel pentagonal contendo enxofre e nitrogênio (figura 7) que são utilizados, normalmente, no tratamento da diabetes mellitus tipo II. Contudo, diversas outras atividades são observadas em compostos que contenham tal grupamento, como exemplo, temos a atividade anti-*Candida* spp. (Tuncbilek e Altanlar, 2006; Ates-Alagoz, Altanlar e Buyukbingol, 2009; Da Silva *et al.*, 2014; Marc *et al.*, 2018), anti-*Aspergillus* spp. (Moorthy, Ekambaram e Perumal, 2014), antiparasitária (Tenório *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2016), hipolipemiante (Iqbal *et al.*, 2012).

Figura 7 - Representação da estrutura geral de tiazolidinadiona.

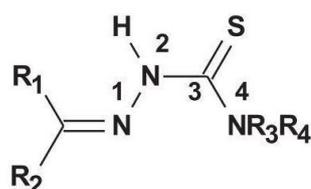


2.2.4 Tiossemicarbazona

As tiossemicarbazona é de interesse farmacêutico, por conta das atividades biológicas que compostos com a sua presença demonstraram, como exemplo, atividade antifúngica (Qin *et al.*, 2012) – anti-*Candida* spp. (Parwana, Singh e Talwar, 1985; Rodríguez-Argüelles *et al.*, 2005; Parrilha *et al.*, 2011; Araújo Neto *et al.*, 2017), anti-*Aspergillus fumigatus* (Parwana, Singh e Talwar, 1985) e anti-*Cryptococcus neoformans* (Araújo Neto *et al.*, 2017) - antiparasitária (Bharti *et al.*, 2002; Tenório *et al.*, 2009), antiviral (Casas *et al.*, 1998; Bal *et al.*, 2005, Genova *et al.*, 2004), antitumoral (Liu, Lin, e Sartorelli, 1992; Niu *et al.*, 1998).

A estrutura química de tiossemicarbazona está representada na figura 8, seguindo como referência Panico, Powell e Richer, 1993.

Figura 8 - Representação da estrutura geral de tiossemicarbazona.



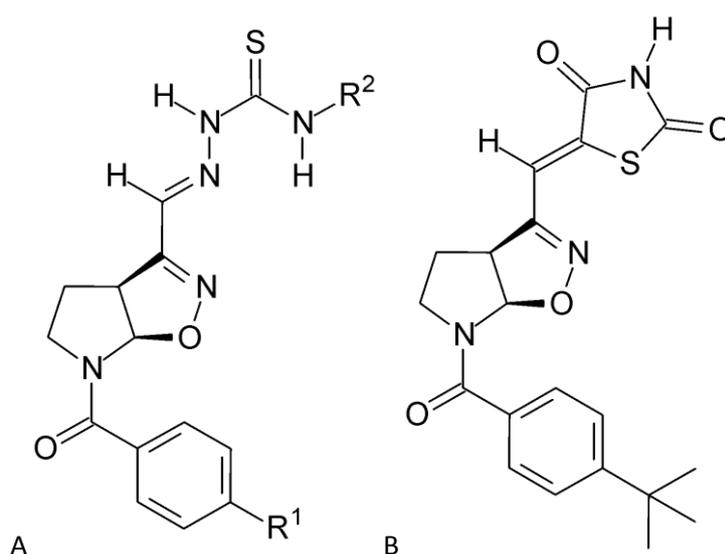
R_1, R_2, R_3 e $R_4 = H, \text{Alquil e aril}$

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 HÍBRIDOS MOLECULARES

Ao todo, três compostos híbridos de isoxazolina foram utilizados, sendo dois compostos híbridos de isoxazolina/tiossemicarbazona (NB) e um composto híbrido de isoxazolina/tiazolidina-2,4-diona (AN) (figura 9), foram cedidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos (LASOF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, bem como o perfil citotóxico de AN-02 (Apêndice A).

Figura 9 - Representação das estruturas químicas dos compostos híbridos de 2-isoxazolina azabíclica utilizado nos testes para a verificação de atividade antifúngica.



Legenda: Híbridos racêmicos - A - NB-5 ($R^1 = \text{Cl}$, $R^2 = \alpha\text{-naftil}$) e NB-6 ($R^1 = \text{F}$, $R^2 = 3\text{-piridil}$); B - AN-02.

3.2 TESTE QUALITATIVO PARA PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O teste qualitativo para avaliação da atividade antifúngica dos diferentes fármacos planejados foi realizado em triplicata por técnica de difusão em disco de papel em meio ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de azul de metileno contido em placas de Petri conforme descrito no documento M44-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* de 2009 (Mackeen *et al.*, 2000; Ficker *et al.*, 2003). As 20 cepas de *Candida* que foram testadas incluem *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e foram fornecidas pela Coleção de Culturas *University Recife Mycologia* - URM - da UFPE (tabela 1).

Tabela 1 - Informações sobre os isolados fornecidos pela Coleção de Culturas URM (UFPE) e que foram utilizados nos testes qualitativos para a prospecção da atividade antifúngica dos compostos híbridos.

Registro URM*	Espécie	Substrato**	Ano de incorporação
4986	<i>Candida albicans</i>	Secreção Vaginal	2005
4987	<i>Candida albicans</i>	Secreção Vaginal	2005
4990	<i>Candida albicans</i>	Secreção Vaginal	2005
6952	<i>Candida albicans</i>	Secreção Traqueal	2010
5749	<i>Candida albicans</i>	Mucosa Esofágica	2008
4127	<i>Candida albicans</i>	Região Inguinal	1999
4264	<i>Candida glabrata</i>	Secreção Orofaríngea	2000
6393	<i>Candida glabrata</i>	Sangue	2011
5715	<i>Candida guilliermondii</i>	Sangue	2008
5716	<i>Candida guilliermondii</i>	Sangue	2008
5717	<i>Candida guilliermondii</i>	Sangue	2008
109	<i>Candida krusei</i>	Sem informação	1954
5840	<i>Candida krusei</i>	Sangue	2008
6390	<i>Candida krusei</i>	Sangue	2011
4607	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue	2003
5731	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue	2007
5695	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue	2007
4262	<i>Candida tropicalis</i>	Secreção Orofaríngea	2000
6551	<i>Candida tropicalis</i>	Cavidade oral	2012
5693	<i>Candida tropicalis</i>	Sangue	2007

Legenda: *Código do isolado na Coleção de Culturas URM da Universidade Federal de Pernambuco; ** Substrato de isolamento do fungo, tal informação foi repassada pela Coleção de Cultura.

As cepas foram cultivadas em tubos contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose - SDA – (Kasvi, Itália) enriquecidos com extrato de levedura, por 24 h horas a 37 °C, antes da padronização do inóculo. Em seguida, o inóculo foi preparado na concentração de 1 a 2 x 10⁶ UFC/mL (*Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI, 1999) em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina, referente a turbidez da escala 0,5 de MCFarland (Becton, Dickinson and Company, EUA). A suspensão padrão foi então semeada com auxílio do *swab* em toda a superfície do meio ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Itália) suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno.

Posteriormente, 10 µL dos novos fármacos foram transferidos para discos papel de filtro esterilizados. Discos contendo fluconazol (Sigma-Aldrich, EUA) e anfotericina B (Cristália, Brasil)

foram utilizados como controle da atividade antifúngica. Concomitantemente, foi realizado o controle negativo do solvente DMSO utilizado na solubilização dos fármacos em discos de papel. Sendo as concentrações dos híbridos por disco de 50 µg, do fluconazol de 25 µg e da anfotericina B de 100 µg.

As placas de Petri após o semeio e colocação dos discos de papel foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas para posterior leitura e interpretação. As zonas de inibição foram medidas em milímetro por halômetro, o valor final da zona de inibição foi a média das triplicatas.

3.3 TESTE QUANTITATIVO PARA PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a realização dos testes quantitativos empregou-se o método de microdiluição em caldo, baseado na técnica preconizada pelo CLSI (2012) no documento M27-S4, em placas esterilizadas de microtitulação com 96 poços, de fundo chato, com tampa.

Dos isolados de *Candida* spp. utilizados e descritas anteriormente para o teste qualitativo por difusão em disco (tabela 1), se escolheu, de maneira aleatória 10 isolados para serem testados nesta técnica.

Os isolados escolhidos encontram-se descritos na tabela 2. Neste experimento, também se utilizou a cepa padrão de *C. parapsilosis* da *American Type Culture Collection* (ATCC 22019) como controle de validação do teste.

Tabela 2 - Isolados de clínicos de *Candida* spp. utilizados nos testes quantitativos para a prospecção da atividade antifúngica dos compostos híbridos.

Registro URM*	Espécie
4990	<i>Candida albicans</i>
4264	<i>Candida glabrata</i>
6393	<i>Candida glabrata</i>
5716	<i>Candida guilliermondii</i>
109	<i>Candida krusei</i>
5840	<i>Candida krusei</i>
4607	<i>Candida parapsilosis</i>
5731	<i>Candida parapsilosis</i>
4262	<i>Candida tropicalis</i>
6551	<i>Candida tropicalis</i>

Legenda: * - Código do isolado na Coleção de Culturas URM da Universidade Federal de Pernambuco.

- Meio de cultura: Para o teste de susceptibilidade antifúngica pela técnica de microdiluição o meio utilizado foi o caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) cuja

concentração final foi 0,165 mol.L⁻¹ e pH 7,0. O meio de cultura foi esterilizado por filtração a vácuo em membranas de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

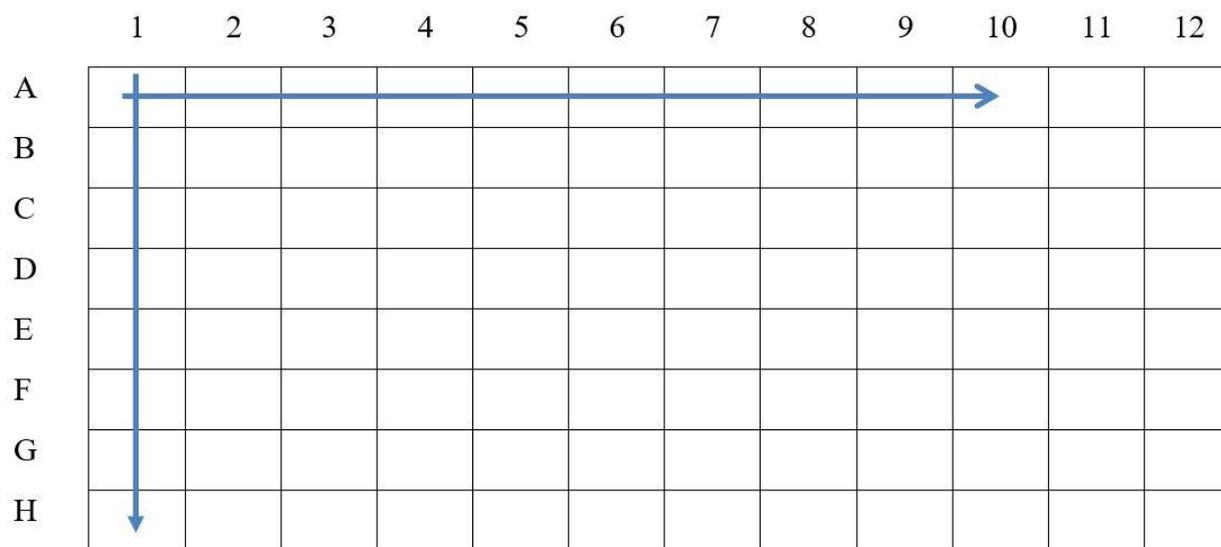
- **Preparação da suspensão fúngica:** A preparação do inóculo de leveduras teve sua padronização segundo as recomendações do documento M27-A3 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). As cepas foram previamente cultivadas em SDA a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, com auxílio de uma alça esterilizada, se retira uma colônia de 1 mm de diâmetro para preparo de uma suspensão em 5 mL solução salina 0,85% (previamente esterilizada). A suspensão foi agitada e a densidade celular foi ajustada com transmitância de 90%, determinada por espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 530 nm. Ao final desta técnica, o inóculo apresentou concentração de 1 a 5x10⁶ UFC/mL.

- **Solubilização dos fármacos:** Os novos fármacos sintetizados e o fluconazol (Sigma-Aldrich, EUA) foram diluídos em 1mL de DMSO previamente esterilizado, e posteriormente foi filtrada a vácuo em membranas de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

- **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM):** Para o teste de sensibilidade foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços com tampas (TPP; Trasadingen, Suíça). Sendo realizada diluição de 1:100 do inóculo em salina previamente esterilizada e posteriormente, se fez uma diluição de 1:20 em RPMI 1640. O inóculo foi adicionado aos poços contendo 100 µL de RPMI 1640 e 100 µL de fármaco, posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3.4 TESTE DE INTERAÇÃO HÍBRIDO/FLUCONAZOL PARA PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA - *CHECKERBOARD* - TABULEIRO DE XADREZ

Para o teste de interação medicamentosa, pela técnica *checkerboard* (figura 4), utilizou-se placas de microtitulação planas de 96 poços com tampas (TPP; Trasadingen, Suíça). Em todos os poços foram distribuídos 100 µL de RPMI 1640 e posteriormente, nas linhas de A-H foi adicionado 100 µL de fluconazol (Sigma-Aldrich, EUA) - concentração de 512 µg/mL - e realizada a diluição seriada (da esquerda para a direita) do poço do 1 até o 10. Depois, adicionado 100 µL do híbrido (concentração de 256 µg/mL) na linha A das colunas 1 a 10 e a diluição seriada (de cima para baixo) foi realizada da linha A até a H (figura 10). Seguindo isso, adicionou-se 100 µL do inóculo previamente diluído (1:100 em salina e de 1:20 em RPMI 1640); onde foram incubados em estufa à 35 °C por 48h.

Figura 10 - Desenho esquemático da colocação dos fármacos na placa de microtitulação para o teste do *checkerboard*.

Legenda: Linhas de A- H; Colunas de 1 – 12. Poço A-1: Maior concentração dos fármacos; Poço H-10: Menor concentração dos fármacos.

→ Fluconazol – diluição seriada: da maior (1) concentração a menor (10).
 ↓ Híbrido – diluição seriada: da maior (A) concentração a menor (H)

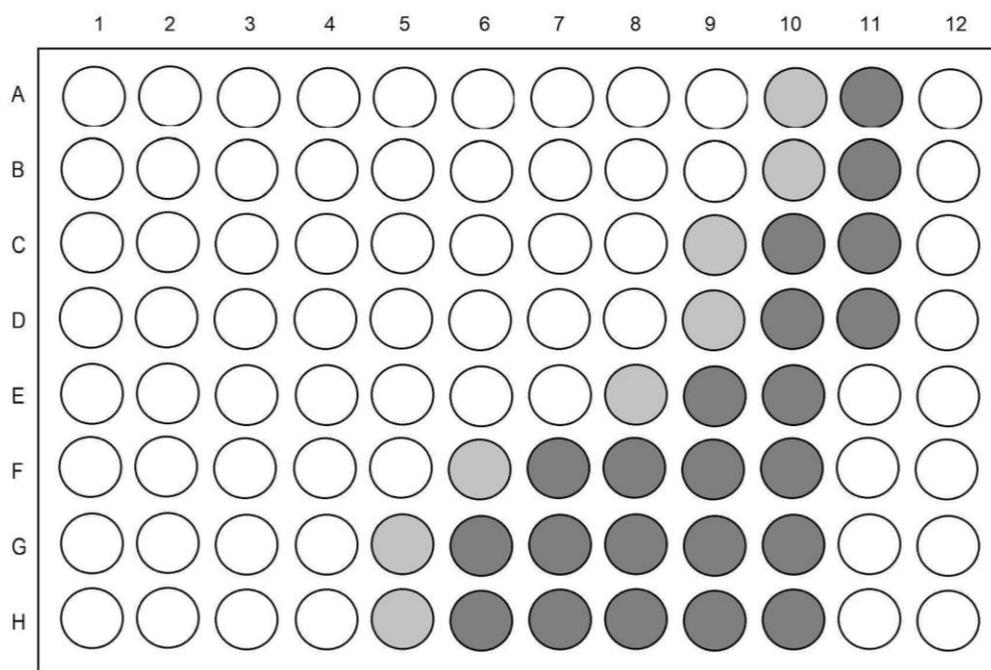
O *endpoint* do fluconazol foi concordante com o documento M27-A3, em que as concentrações do fluconazol variaram de 64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e dos híbridos de 64 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Os poços das colunas 11 foram utilizados como controles de crescimento e esterilidade do meio na coluna 12 como controle de esterilidade de cada um dos compostos (figura 11).

As análises seguem os estudos de Barchiesi *et al.* (1998) e de Arai, Sugita e Nishikawa (2005) quando o resultado da CIM é $>64 \mu\text{g/mL}$ do híbrido e fluconazol foi considerada a diluição anterior (128 $\mu\text{g/mL}$), mesmo que essa não tenha sido testada para o cálculo do FICI (Índice de Concentração Inibitória Fracionária), já as menores CIMs (0,125 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do híbrido) se mantiveram inalteradas.

A leitura foi realizada visualmente, a fim de encontrar o poço que equivale a inibição de 50% do crescimento fúngico, seguindo a metodologia proposta por Den Hollander *et al.* (1998) em que cada uma das linhas de testes tem seu poço de inibição indicado (figura 11).

No fim, cada linha teve sua Concentração Inibitória Fracionária - FIC - calculada individualmente e depois foi calculada uma média para se obter o FICI a ser interpretado.

Figura 11 - Representação do método de leitura proposto por Den Hollander *et al.* (1998) onde cada linha tem seu poço de inibição indicado na técnica do *checkerboard*.



Nota: coluna 11: controle positivo (A-D) e controle de esterilidade do meio de cultura (E-H); coluna 12: controle de esterilidade do fluconazol (A-D) e do híbrido (E-H); Legenda: cor mais escura: representa o crescimento igual ao controle de crescimento; cor intermediária: representa inibição de 50% do crescimento fúngico - poço a ser escolhido para análise - quando comparada ao controle de crescimento; cor branca representa a inibição total do crescimento fúngico.

O FICI é calculado a partir da soma da FIC (Concentração Inibitória Fracionária) de cada composto e, neste trabalho, de cada linha, sendo calculados da seguinte forma:

$$FIC_{FLZi} = \text{CIM do fluconazol em combinação} / \text{CIM do fluconazol sozinho}$$

$$FIC_{HBDi} = \text{CIM do híbrido em combinação} / \text{CIM do híbrido sozinho}$$

$$FICI = \sum (FIC_{FLZi} + FIC_{HBDi}) / N$$

Onde i equivale a/as linha (as) (A-H) e N o número de linhas que foi possível estabelecer o poço em questão.

Com o valor do FICI é possível definir se a interação foi sinérgica quando $FICI \leq 0,5$, indiferente em $4 \geq FICI > 0,5$ e antagônico/aditivo em $FICI > 4$ (Johnson *et al.*, 2004).

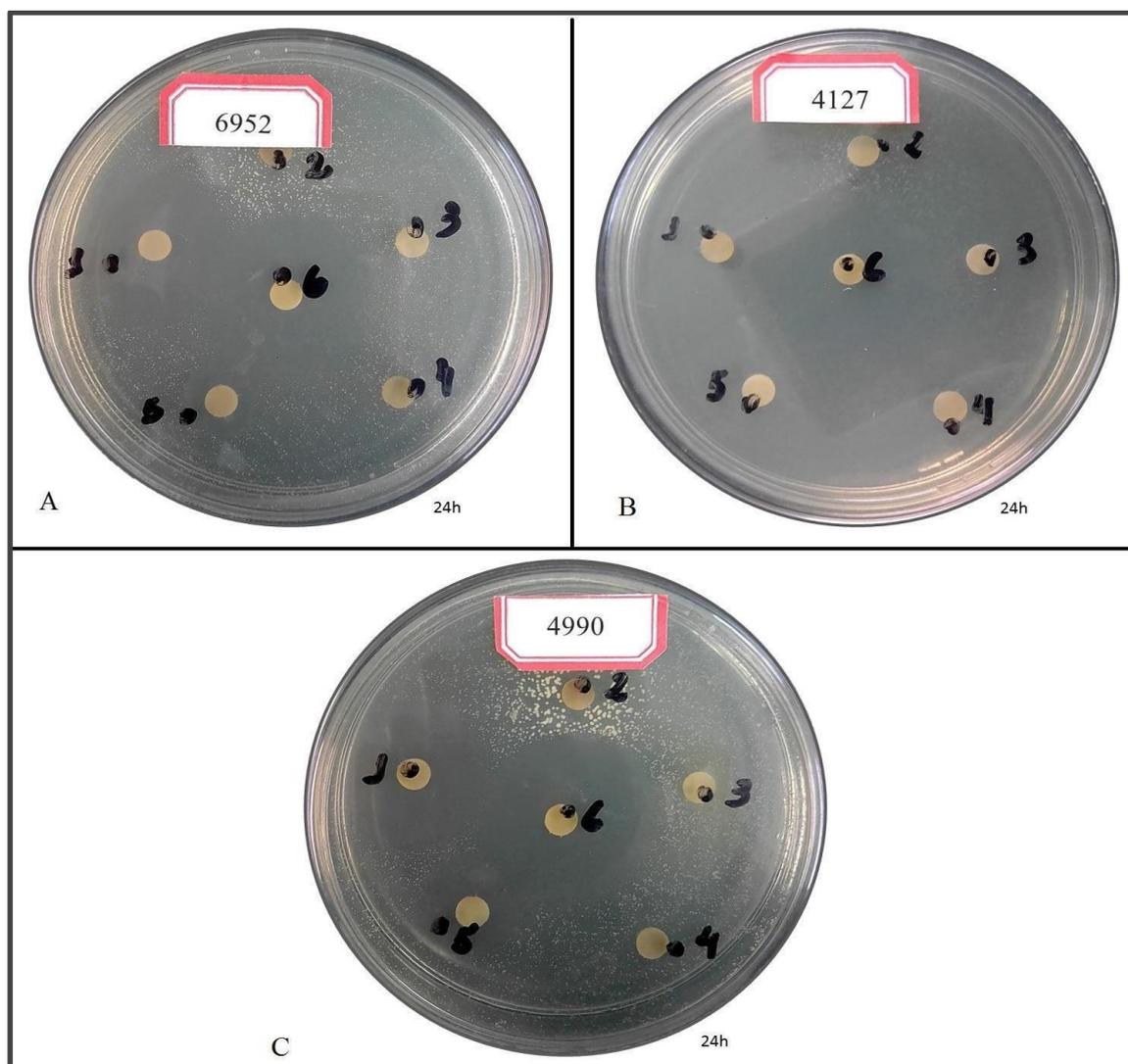
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Nos testes de difusão em disco de papel *Candida guilliermondii* URM 5715 e *C. albicans* URM 4986 não tiveram crescimento significativo para a determinação da sensibilidade, sendo estas desconsideradas para as análises subsequentes.

Os demais não foram sensíveis aos compostos híbridos AN-02, NB-5 e NB-6 em nenhuma das metodologias testadas, entretanto foi observada, na área de difusão do AN-02, a presença de colônias maiores quando comparadas as demais colônias existente na placa de teste em três isolados de *C. albicans* URM 4127, URM 4990 e URM 6952 na concentração de 50 µg (figura 12).

Figura 12 - Teste de difusão em disco, após 24h de crescimento, para a observação do crescimento dos isolados de *Candida albicans* pelo híbrido AN-02.



Legenda: 1- fluconazol; 2 - AN-02; 3 - NB-5; 4 - NB-6; 5 - DMSO (puro); 6 - anfotericina B.

O método de difusão em disco possui limitações que podem interferir posteriormente na leitura, uma vez, que a depender do composto a sua solubilização no ágar pode ser reduzida, outro interferente é o tipo de solvente escolhido e na espessura do ágar na placa de Petri (Sejas *et al.*, 2003), por conta disso é necessário a realização de outra técnica que minimize tais limitações, sendo escolhida neste estudo o método de microdiluição em caldo.

Em relação aos controles, se notou que as cepas de *Candida krusei* foram resistentes ao fluconazol, apresentando Concentração Inibitória Mínima - CIM - de 64 µg/mL, os outros isolados foram sensíveis ao mesmo, a CIM de cada isolado é apresentada na tabela 3. Ao considerarmos a anfotericina B, todos os isolados foram sensíveis na concentração de 100 µg pela técnica de difusão em disco de papel.

Tabela 3 - Resultados dos testes de microdiluição em caldo.

ISOLADO UTILIZADO	CIM (fluconazol)
<i>Candida albicans</i> URM 4990	4
<i>Candida glabrata</i> URM 4264	4
<i>Candida glabrata</i> URM 6393	4
<i>Candida krusei</i> URM 109	64
<i>Candida krusei</i> URM 5840	64
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	4
<i>Candida parapsilosis</i> URM 5731	2
<i>Candida tropicalis</i> URM 4262	1
<i>Candida tropicalis</i> URM 6551	1

* CIM – Concentração Inibitória Mínima - em µg/mL.

Uma mudança foi observada nas características dos isolados *C. krusei* URM 109, *C. albicans* URM 4990 e *C. tropicalis* URM 4262 que apresentaram neste estudo CIM de 64 µg/mL, 4 µg/mL e 1 µg/mL e no de Mendonça-Junior *et al.* (2011) com CIM foram de 16 µg/mL, >64 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, além disso tais isolados foram sensibilizados por ao menos um dos compostos derivados de 2-(Substituído-Amino)-4,5-Dialquil-Tiofeno-3-Carbonitrilo presente no estudo de Mendonça-Junior *et al.* (2011).

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, dos quais os híbridos testados não possuíram atividade anti-*Candida*, os compostos derivados de isoxazolininas sintetizados por Sharma *et al.* (2009) demonstraram atividade frente a três isolados de *Candida albicans*, com CIM do fluconazol variando de 11 a 25,5 µg/mL. Na pesquisa de Bano *et al.* (2015) que produziram híbridos de isoxazolina e pirazolina, a atividade frente a *C. albicans* foi verificada ao se encontrar CIM de 12,5 a 50 µg/mL.

Ao considerarmos compostos de tiazolidinadiona e tiossemicarbazona nota-se que a boa parte dos derivados possuem atividade frente a *Candida* spp., sendo possível observá-la nos trabalhos de Marc *et al.* (2018), Tuncbilek e Altanlar (2006), Ates-Alagoz, Altanlar e Buyukbingol (2009) e em Araújo Neto *et al.* (2017) e Parrilha *et al.* (2011).

No estudo de Araújo Neto *et al.* (2017) que utilizaram os isolados *C. tropicalis* URM 6551 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, isolados estes que compõem este estudo, não foi observada a atividade de seus compostos derivados de 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazona frente *C. tropicalis* URM 6551, o resultado frente a este isolado corrobora, de algum modo, com os nossos resultados, entretanto ao considerarmos o isolado *C. parapsilosis* ATCC 22019 os resultados foram opostos, uma vez que neste não foi observada nenhuma atividade inibitória.

4.2 INTERAÇÃO COMPOSTO/FLUCONAZOL FRENTE A *Candida* spp.

Nenhuma das substâncias híbridas testadas apresentaram atividade anti-*Candida* quando utilizados isoladamente, contudo ao combiná-los com o fluconazol, verificou-se a existência de interação sinérgica, levando em consideração os intervalos de Johnson *et al.* (2004), frente ao isolado *C. albicans* URM 4990 nas combinações NB-5/fluconazol e NB-6/fluconazol (tabela 4), uma vez que o Índice de Concentração Inibitória Fracionária – FICI – foi menor ou igual a 0,5 com FICI de 0,27294 e 0,26513, respectivamente.

Mesmo não se fazendo uso de compostos híbridos alguns estudos podem ser comparáveis a este, uma vez que o composto testado exerceu atividade antifúngica quando combinados a outro composto, um exemplo disso são os resultados encontrados por Denardi *et al.* (2015), eles comunicaram que o tacrolimus (FK506) exercia efeito sinérgico em combinação ao fluconazol frente isolados de *C. glabrata*. Em outro estudo, Arai, Sugita e Nishikawa (2005), utilizaram um antiinflamatório não-esteroidal, o ibuprofeno, juntamente com o fluconazol e constataram o efeito sinérgico em três isolados de *C. albicans* conhecidamente resistentes ao fluconazol.

Ao compararmos estudos envolvendo quaisquer compostos híbridos podemos notar que em uma mesma série híbrida podem existir interações distintas, ressaltando que a conformação da molécula e seus radicais são imprescindíveis para a potencialização ou não da atividade antifúngica. Sendo possível notá-las no estudo de Ahmad *et al.* (2017), relataram que dos 12 derivados cíclicos de chalcona, 5 foram antagônicos e 2 sinérgicos frente *C. albicans* ATCC 90028, 4 e 5 em *C. albicans* A71, respectivamente, os demais foram indiferentes.

No de Carvalho *et al.* (2018), ao testarem a interação dos compostos derivados de Guttiferona-A com o fluconazol, em espécies *Candida* não-*C. albicans*, constatou a presença de interação sinérgica diante de um dos isolados testados, *C. glabrata* ATCC 90030, e indiferente em *C. krusei*

ATCC 6258 e no de Wang *et al.* (2016), ao testarem 24 derivados de chalcona frente *C. albicans* resistente ao fluconazol, relatou que mais que a metade das combinações foram sinérgicas.

Neste trabalho, a interação AN-02/fluconazol foi antagônica em isolados de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, assim como o NB-5/fluconazol em *C. glabrata* URM 6393 (tabela 4) com FICI maior que 4.

Tabela 4 - Resultados dos testes de interação sinérgica a partir da técnica do *checkerboard* dos híbridos de 2-isoxazolina azabicíclica frente a *Candida* spp., por meio da interpretação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária - FICI.

ISOLADO UTILIZADO	FLZ - CIM	FICI - AN-02/FLZ	FICI - NB-5/FLZ	FICI - NB-6/FLZ
<i>Candida albicans</i> URM 4990	4	0,73388	0,27294	0,26513
<i>Candida glabrata</i> URM 4264	4	4,87451	2,37451	2,62451
<i>Candida glabrata</i> URM 6393	4	5,37451	5,62451	3,87451
<i>Candida krusei</i> URM 109	64	1,01464	1,07087	1,07087
<i>Candida krusei</i> URM 5840	64	1,01464	1,07087	1,04101
<i>Candida tropicalis</i> URM 4262	1	20,2495	1,49951	1,49951
<i>Candida tropicalis</i> URM 6551	1	9,37451	1,24951	1,49951
<i>Candida parapsilosis</i> URM 5731	2	0,93701	1,56201	0,81201
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	4	0,87451	0,68701	1,24951

Nota: Leitura e análise foram adaptadas de Den Hollander *et al.* (1998) e Barchiesi *et al.* (1998); Valor da Concentração Inibitória Mínima - CIM - em µg/mL. Sinergismo: $FICI \leq 0,5$, indiferença: $4 \geq FICI > 0,5$ e antagonismo: $FICI > 4$ (Johnson *et al.*, 2004). Os isolados *Candida guilliermondii* URM 5716 e *C. parapsilosis* URM 4607 não apresentaram crescimento para a realização das leituras dos testes.

Legenda: FLZ - fluconazol;

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As substâncias híbridas de 2-isoxazolina azabicíclica utilizadas não apresentaram atividade frente as espécies de *Candida*, confirmando que a presença do núcleo de isoxazolina não garante que a molécula híbrida apresente atividade antifúngica. Entretanto, quando foram associadas ao fluconazol, duas combinações diminuíram o *endpoint* do fluconazol em isolado clínico de *Candida albicans*.

Assim, se faz necessário a realização de mais testes *in vitro* e *in vivo* com diferentes isolados de *C. albicans* e de outras espécies para investigar se estas combinações híbrido/fluconazol podem ser utilizadas futuramente como uma nova estratégia de uso clínico, principalmente, para as linhagens resistentes aos fármacos utilizados na terapêutica.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Aijaz *et al.* Synergistic antifungal effect of cyclized chalcone derivatives and fluconazole against *Candida albicans*. **MedChemComm**, v. 8, n. 12, p. 2195-2207, 2017.
- AHMAD, Anis; KHAN, Asad U. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v. 144, n. 1, p. 68-71, 2009.
- DE ALENCAR, Débora de Souza Olartechea *et al.* Candidaemia due to *Candida parapsilosis* species complex at a hospital in Brazil: clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 34, n. 2, p. 106-108, 2017.
- ALEXANDER, Barbara D. *et al.* Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.
- ALTHAUS, Vanusa Aparecida *et al.* Espécies se *Candida* spp. em Isolados Clínicos e Suscetibilidade a Antifúngicos de uso Hospitalar. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, p. 7-17, 2015.
- AMIN, Kamelia M.; RAHMAN, Doaa E. Abdel; AL-ERYANI, Yasmin A. Synthesis and preliminary evaluation of some substituted coumarins as anticonvulsant agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5377-5388, 2008.
- ARAI, R.; SUGITA, T.; NISHIKAWA, A. Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 38-41, 2005.
- DE ARAÚJO NETO, Luiz Nascimento *et al.* Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-biological interactions**, v. 272, p. 172-181, 2017.
- ARROIO, Agnaldo; HONÓRIO, Káthia M.; DA SILVA, Albérico BF. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.
- ARTHINGTON-SKAGGS, Beth A.; REX, John H. Resistance to antifungal agents. In: **Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century**. Springer, Boston, MA, 2008. p. 325-369.
- ATES-ALAGOZ, Zeynep; ALTANLAR, Nurten; BUYUKBINGOL, Erdem. Synthesis and antimicrobial activity of new tetrahydro-naphthalene-thiazolidinedione and thiohydantoin derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1375-1379, 2009.
- BAL, Tanushree Ratan *et al.* Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin β -thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 20, p. 4451-4455, 2005.
- BANO, Sameena *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking of some substituted pyrazolines and isoxazolines as potential antimicrobial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 95, p. 96-103, 2015.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARCHIESI, Francesco *et al.* In-vitro interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 59-65, 1998.

BENNETT, John E.; IZUMIKAWA, Koichi; MARR, Kieren A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1773-1777, 2004.

BHAT, Bashir A. *et al.* Synthesis and antihyperglycemic activity profiles of novel thiazolidinedione derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 22, p. 5857-5864, 2004.

BHARTI, Neelam *et al.* Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3475-3478, 2002.

BITEW, Adane; ABEBAW, Yeshiwork. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. **BMC women's health**, v. 18, n. 1, p. 94, 2018.

BREMENKAMP, RM1 *et al.* Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 6, p. 549-555, 2011.

BRITO, Ligia R. *et al.* Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.

CALDERONE, R. 2002. **Candida and Candidiasis**. Washington D.C: AMS.

CARRILLO-MUNOZ, A. J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

DE CARVALHO, R. Ribeiro *et al.* Promising synergistic activity of fluconazole with bioactive Guttiferone-A and derivatives against non-albicans *Candida* species. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 4, p. 645-650, 2018.

CASAS, José S. *et al.* Diorganotin (IV) complexes of pyridoxal thiosemicarbazone: Synthesis, spectroscopic properties and biological activity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 283-292, 1998.

CELEBI, Solmaz *et al.* Nosocomial candidaemia in children: results of a 9-year study. **Mycoses**, v. 51, n. 3, p. 248-257, 2008.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Candida auris**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/candida-auris-qanda.html>>. Acesso em: 31 de dezembro de 2018.

CHAVAN, R. S.; KHADKE, A. P. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Indolyl Isoxazoline Derivatives as Analgesic and Antiinflammatory Agents. **Asian journal of chemistry**, v. 24, n. 6, 2012.

CHEN, Sharon C.-A.; SLAVIN, Monica A.; SORRELL, Tania C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. **Drugs**, v. 71, n. 1, p. 11-41, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3(28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, 2nd ed., M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Suscetibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI Document M27-S4.

COLOMBO, Arnaldo Lopes *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003.

CONSTANT, J.M.C. *et al.* **Antibióticos e quimioterápicos antimicrobianos**. EDUFAL. p. 227-244, 2013.

COWEN, Leah E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 187, 2008.

DA SILVA, Ivanildo Manguiera *et al.* Synthesis and antimicrobial activities of 5-Arylidene-thiazolidine-2, 4-dione derivatives. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

DALAZEN, Daniela *et al.* Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DEN HOLLANDER, Jan G.; MOUTON, Johan W.; VERBRUGH, Henri A. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 744-748, 1998.

DENARDI, Laura Bedin *et al.* Synergistic effects of tacrolimus and azole antifungal compounds in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 125-129, 2015.

DESAI, N. C. *et al.* Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some novel thiazole clubbed 1, 3, 4-oxadiazoles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 67, p. 54-59, 2013.

DIOMEDI, P. *et al.* Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista chilena de infectología**, v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.

EL-WAHAB, H. Abd *et al.* Synthesis and characterization of coumarin thiazole derivative 2-(2-amino-1, 3-thiazol-4-yl)-3H-benzo [f] chromen-3-one with anti-microbial activity and its potential

application in antimicrobial polyurethane coating. **Progress in Organic Coatings**, v. 77, n. 9, p. 1506-1511, 2014.

ERICSSON, J. *et al.* Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. E218-E221, 2013.

FICKER, Christine E. *et al.* Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). **Journal of ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 289-293, 2003.

GUARRO, Josep; GENÉ, Josepa; STCHIGEL, Alberto M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GARNACHO-MONTERO, José *et al.* Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3149-3154, 2010.

GENOVA, Petia *et al.* Toxic effects of bis (thiosemicarbazone) compounds and its palladium (II) complexes on herpes simplex virus growth. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 197, n. 2, p. 107-112, 2004.

GHANNOUM, M.A.; Rice, L.B. Antifúngicos: modo de ação, mecanismos de resistência e correlação desses mecanismos com resistência bacteriana. **Revisões Clínicas em Microbiologia**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GOMHA, Sobhi M.; SALAH, Taher A.; ABDELHAMID, Abdou O. Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of some novel thiadiazoles and thiazoles incorporating pyrazole moiety as anticancer agents. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 146, n. 1, p. 149-158, 2015.

IQBAL, AK Mohammed *et al.* Synthesis, hypoglycemic and hypolipidemic activities of novel thiazolidinedione derivatives containing thiazole/triazole/oxadiazole ring. **European journal of medicinal chemistry**, v. 53, p. 308-315, 2012.

JAJOO, M. *et al.* Taxas alarmantes de resistência antimicrobiana e sepse fúngica em recém-nascidos no norte da Índia. **PLoS um**, v. 13, n. 6, p. e0180705, 2018.

JENSEN, Rasmus Hare *et al.* Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551-2555, 2015.

JOHNSON, M.D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JUNIOR, FJB Mendonça *et al.* Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4, 5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 8, p. 1492-1499, 2011.

KALLITSAKIS, Michael G. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Novel Hybrid Molecules Containing Purine, Coumarin and Isoxazoline or Isoxazole Moieties. **The open medicinal chemistry journal**, v. 11, p. 196, 2017.

KAMAL, Ahmed *et al.* Synthesis of tetrazole–isoxazoline hybrids as a new class of tubulin polymerization inhibitors. **MedChemComm**, v. 3, n. 11, p. 1386-1392, 2012.

KAUFFMAN C.A. **Candidíase**. In: Goldman L, Ausiello D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005; p.2713-17.

KRYSHCHYSHYN, A.; ATAMANYUK, D; LESYK, R. Derivados de tiopirano [2,3,3d]-tiazol fundidos como potenciais agentes anticancerígenos. **Scientia pharmaceutica**, v. 80, n. 3, p. 509-530, 2012.

KUMAR, Koravangala S. Vinay *et al.* Synthesis, antimalarial activity, and target binding of dibenzazepine-tethered isoxazolines. **RSC Advances**, v. 5, n. 110, p. 90408-90421, 2015.

LEE, Wei-Ju *et al.* Factors and outcomes associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* spp versus *Candida albicans* in children. **American journal of infection control**, v. 46, n. 12, p. 1387-1393, 2018.

LEITE, Franco Henrique A. *et al.* Structure-guided discovery of thiazolidine-2, 4-dione derivatives as a novel class of Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 123, p. 639-648, 2016.

LEWIS, Russell E. Current concepts in antifungal pharmacology. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2011. p. 805-817.

LINARES, Carlos Eduardo Blanco *et al.* Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 752-758, 2013.

LINGARAJU, Gejjalagere S. *et al.* Synthesis of new coumarin tethered isoxazolines as potential anticancer agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 23-24, p. 3606-3612, 2018.

LIU, Mao Chin; LIN, Tai Chun; SARTORELLI, Alan C. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiose micarbazone. **Journal of medicinal chemistry**, v. 35, n. 20, p. 3672-3677, 1992.

LIU, Shuyuan *et al.* Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, 2014.

MAILLARD, Ludovic T. *et al.* Synthesis and anti-*Candida* activity of novel 2-hydrazino-1, 3-thiazole derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 6, p. 1803-1807, 2013.

MACKEEN, M. M. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 395-402, 2000.

MANDAWAD, Gajanan G. *et al.* An efficient synthesis of isoxazoline libraries of thiophene analogs and its antimycobacterial investigation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 10, p. 4455-4463, 2014.

MARC, Gabriel *et al.* New N-(oxazolylmethyl)-thiazolidinedione Active against *Candida albicans* Biofilm: Potential Als Proteins Inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2522, 2018.

MENEZES, E.A. Suscetibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas em Russas, Ceará. **RBAC**, v. 48, n. 1, p. 33-8, 2016.

MONDAL, P. *et al.* Synthesis of some new isoxazoline derivatives of chalconised indoline 2-one as a potential analgesic, antibacterial and anthelmintic agents. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 1, p. 38-41, 2012.

MOORTHY, Perumal; EKAMBARAM, Sanmuga Priya; PERUMAL, Senthamil Selvan. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of imidazolyl thiazolidinedione derivatives. **Arabian journal of chemistry**, 2014.

NIKAM, Mukesh D. *et al.* Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some novel tetrazolo [1, 5-a] quinoline incorporated pyrazoline and isoxazoline derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 9, p. 3372-3386, 2015.

NIU, Chuansheng *et al.* Synthesis of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). **Tetrahedron**, v. 54, n. 23, p. 6311-6318, 1998.

NUNES, Emmanuel Borges *et al.* Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). **Orientações Para O Tratamento De Infecções Sexualmente Transmissíveis** - 2005. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42782/9248546269_por.pdf;jsessionid=EC50EBA28378BE8572D2C1BFE99CCDFE?sequence=2>. Acesso em: 19 de outubro de 2018.

ÖZER, Türkan Toka; DURMAZ, Süleyman; YULA, Erkan. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 9, p. 629-632, 2016.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, Jean-Claude. **A guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.

PARRILHA, Gabrieli L. *et al.* Pyridine-derived thiosemicarbazones and their tin (IV) complexes with antifungal activity against *Candida* spp. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1473-1482, 2011.

PARUL, Negi; SUBHANGKAR, Nandy; ARUN, Mahato. Antimicrobial activity of different thiosemicarbazone compounds against microbial pathogens. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 351-363, 2012.

PARWANA, Harjinder K.; SINGH, Gurdev; TALWAR, P. Antifungal activity of metal complexes of thiosemicarbazones. **Inorganica chimica acta**, v. 108, n. 2, p. 87-89, 1985.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos *et al.* Sensibilidade de isolados de *Candida* spp. a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Biosci. j.(Online)**, v. 30, n. 1, p. 304-311, 2014.

PERLIN, David S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 121-130, 2007.

PICCONI, Pietro *et al.* Novel pyridyl nitrofuranyl isoxazolines show antibacterial activity against multiple drug resistant *Staphylococcus* species. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 15, p. 3971-3979, 2017.

PRAJAPTI, Santosh Kumar *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel Δ 2-isoxazoline fused cyclopentane derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. **MedChemComm**, v. 6, n. 5, p. 839-845, 2015.

QIN, Yukun *et al.* Novel thiosemicarbazone chitosan derivatives: preparation, characterization, and antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2664-2670, 2012.

RAJANARENDAR, E. *et al.* Design, synthesis, antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic activity of novel isoxazolyl pyrimido [4, 5-b] quinolines and isoxazolyl chromeno [2, 3-d] pyrimidin-4-ones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 55, p. 273-283, 2012.

RIZZETTO, Lisa; DE FILIPPO, Carlotta; CAVALIERI, Duccio. Mycobiota: micro-eukaryotes inhabiting our body as commensals or opportunistic pathogens. 2015.

RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, María C. *et al.* Copper complexes of imidazole-2-, pyrrole-2- and indol-3-carbaldehyde thiosemicarbazones: inhibitory activity against fungi and bacteria. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 99, n. 11, p. 2231-2239, 2005.

SADEGHI, G. *et al.* Emergence of non-*Candida albicans* species: epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 1, p. 51-58, 2018.

SATOH, Kazuo *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and immunology**, v. 53, n. 1, p. 41-44, 2009.

SEJAS, Lilian M. *et al.* Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **J Bras Patol e Med Labor**, v. 39, p. 27-35, 2003.

SHARMA, Prabodh Chander *et al.* Synthesis of some new isoxazoline derivatives as possible anti-*Candida* agents. **Acta Pol. Pharm. Drug Res**, v. 66, n. 1, p. 101-104, 2009.

SHIGEMURA, Katsumi *et al.* Comparison of the clinical risk factors between *Candida albicans* and *Candida non-albicans* species for bloodstream infection. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 4, p. 311, 2014.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SINGH, U. P.; BHAT, H. R.; GAHTORI, P. Antifungal activity, SAR and physicochemical correlation of some thiazole-1, 3, 5-triazine derivatives. **Journal de mycologie medicale**, v. 22, n. 2, p. 134-141, 2012.

Sobel, J.D. Genital candidiasis. **Medicine**, v. 42, n. 7, p. 364-368, 2014.

SWAPNAJA, K. Jones M. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of diaziridinyl quinone isoxazole hybrids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 117, p. 85-98, 2016.

TANGALLAPALLY, Rajendra P. *et al.* Discovery of novel isoxazolines as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 23, p. 6638-6642, 2007.

TEITZ, Yet al *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- β -4': 4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- β -4': 4'-diallythiosemicarbazone. **Antiviral Research**, v. 24, n. 4, p. 305-314, 1994.

TENORIO, Romulo P. *et al.* Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 10, p. 2575-2578, 2005.

TUNCBILEK, Meral; ALTANLAR, Nurten. Synthesis of New 3-(Substituted Phenacyl)-5-[3'-(4H-4-oxo-1-benzopyran-2-yl)-benzylidene]-2, 4-thiazolidinediones and their Antimicrobial Activity. **Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry**, v. 339, n. 4, p. 213-216, 2006.

VIEIRA, Ana Júlia Hoffmann; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

VIEGAS-JUNIOR, Claudio *et al.* Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007.

WANG, Yuan-Hua *et al.* The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 13, p. 3098-3102, 2016.

WELSH, Rory M. *et al.* Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2996-3005, 2017.

ZOMORODIAN, K. *et al.* Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n. 2, p. 103-110, 2016.

ZGHAB, Imen *et al.* Regiospecific synthesis, antibacterial and anticoagulant activities of novel isoxazoline chromene derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2651-S2658, 2017.

ZHENG, Shilong *et al.* Modification and biological evaluation of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6653-6667, 2014.

APÊNDICE A - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (AN-02)

Cedido por Marlene Saraiva - Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos - LASOF.

Resultado:

CODE	Citotoxicidade (CC ₅₀) μM^a	Fórmula	Molar Mass
AN-02	113,30	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₄ S	399,46

a = citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, MTT foi o método utilizado

Materiais e Métodos

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ – UFPE, coordenados pela Professora Dra. Valéria Pereira Hernandes. Os ensaios foram feitos como sugeridos pela OMS e são testes robustos e de elevada exatidão. Os laboratórios envolvidos apresentam condições de Biossegurança (contenções para NB2) adequadas para execução do trabalho proposto e para trabalho com animais experimentais.

Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c e C57Bl/6, machos, com 6-8 semanas de idade, pesando 20 – 30 g e provenientes do biotério de criação do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ - PE. O protocolo de experimentação animal (processo número 102/2016), utilizado neste trabalho, já foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ com registro 102/2016.

Obtenção de células esplênicas

Células esplênicas foram obtidas de acordo com Pereira e colaboradores. Após sacrifício do animal em câmara de CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 (SigmaAldrich) + 1 % de antibiótico. No fluxo vertical, cada baço foi transferido para placa de Petri onde foram macerados utilizando a parte fosca de lâminas de microscopia. As suspensões celulares foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10mL de meio RPMI + 1 % de antibiótico por baço, centrifugadas a 4 C, 200 x g durante 5 minutos. O sedimento (contendo células) foi ressuscitado em meio RPMI + 1 % de antibiótico + 10 % de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da suspensão celular foi corada com azul de trypan para ser quantificada e verificada a viabilidade celular em câmara de Neubauer (PEREIRA, V. R. A, *et al.*, 2001).

Avaliação da atividade tóxica dos compostos em células de camundongos isogênicos

Macrófagos da linhagem Raw 264.7 (105 células/mL) foram semeados em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL), sendo novamente incubados durante 48h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benznidazol para atividade antichagásica e a miltafosina na atividade leishmanicida. A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a CC50 (concentração citotóxica para 50 % das células) de cada composto por regressão linear simples (GraphPad Prism 5.0).

APÊNDICE B - CÁLCULOS PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONÁRIA – FICI

FUNGO	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC AN-2 COMB	MIC AN-2 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI AN-02	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC NB-5 COMB	MIC NB-5 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI NB-05	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC NB-6 COMB	MIC NB-6 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI NB-06
4262	32	1	32	64	128	0,5	32,5	20,24951	4	1	4	64	128	0,5	4,5	1,499511	4	1	4	64	128	0,5	4,5	1,499511
	8	1	8	32	128	0,25	8,25		1	1	1	32	128	0,25	1,25		1	1	1	32	128	0,25	1,25	
	8	1	8	16	128	0,125	8,125		1	1	1	16	128	0,125	1,125		1	1	1	16	128	0,125	1,125	
	8	1	8	8	128	0,0625	8,0625		1	1	1	8	128	0,0625	1,0625		1	1	1	8	128	0,0625	1,0625	
	64	1	64	4	128	0,03125	64,03125		1	1	1	4	128	0,03125	1,03125		1	1	1	4	128	0,03125	1,03125	
	32	1	32	2	128	0,015625	32,015625		1	1	1	2	128	0,015625	1,015625		1	1	1	2	128	0,015625	1,015625	
	8	1	8	1	128	0,007812	8,007825		1	1	1	1	128	0,007812	1,007812		1	1	1	1	128	0,007812	1,007812	
	1	1	1	0,5	128	0,003906	1,003906		1	1	1	0,5	128	0,003906	1,003906		1	1	1	0,5	128	0,003906	1,003906	
6551	16	1	16	64	128	0,5	16,5	9,374511	2	1	2	64	128	0,5	2,5	1,249511	4	1	4	64	128	0,5	4,5	1,499511
	8	1	8	32	128	0,25	8,25		1	1	1	32	128	0,25	1,25		1	1	1	32	128	0,25	1,25	
	8	1	8	16	128	0,125	8,125		1	1	1	16	128	0,125	1,125		1	1	1	16	128	0,125	1,125	
	32	1	32	8	128	0,0625	32,0625		1	1	1	8	128	0,0625	1,0625		1	1	1	8	128	0,0625	1,0625	
	4	1	4	4	128	0,03125	4,03125		1	1	1	4	128	0,03125	1,03125		1	1	1	4	128	0,03125	1,03125	
	4	1	4	2	128	0,015625	4,015625		1	1	1	2	128	0,015625	1,015625		1	1	1	2	128	0,015625	1,015625	
	1	1	1	1	128	0,007812	1,007812		1	1	1	1	128	0,007812	1,007812		1	1	1	1	128	0,007812	1,007812	
	1	1	1	0,5	128	0,003906	1,003906		1	1	1	0,5	128	0,003906	1,003906		1	1	1	0,5	128	0,003906	1,003906	
109	-	-	-	-	-	-	-	1,014648	-	-	-	-	-	-	-	1,070870	-	-	-	-	-	-	-	1,070870
	-	-	-	-	-	-	-		64	64	1	32	128	0,25	1,25		64	64	1	32	128	0,25	1,25	
	-	-	-	-	-	-	-		64	64	1	16	128	0,125	1,125		64	64	1	16	128	0,125	1,125	
	-	-	-	-	-	-	-		64	64	1	8	128	0,0625	1,0625		64	64	1	8	128	0,0625	1,0625	
	64	64	1	4	128	0,03125	1,03125		64	64	1	4	128	0,03125	1,03125		64	64	1	4	128	0,03125	1,03125	
	64	64	1	2	128	0,015625	1,015625		64	64	1	2	128	0,015625	1,015625		64	64	1	2	128	0,015625	1,015625	
	64	64	1	1	128	0,007812	1,007812		64	64	1	1	128	0,007812	1,007812		64	64	1	1	128	0,007812	1,007812	
	64	64	1	0,5	128	0,003906	1,003906		64	64	1	0,5	128	0,003906	1,003906		64	64	1	0,5	128	0,003906	1,003906	
5840	-	-	-	-	-	-	-	1,014648	-	-	-	-	-	-	-	1,070870	-	-	-	-	-	-	-	1,041015
	-	-	-	-	-	-	-		64	64	1	32	128	0,25	1,25		-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-		64	64	1	16	128	0,125	1,125		64	64	1	16	128	0,125	1,125	
	-	-	-	-	-	-	-		64	64	1	8	128	0,0625	1,0625		64	64	1	8	128	0,0625	1,0625	
	64	64	1	4	128	0,03125	1,03125		64	64	1	4	128	0,03125	1,03125		64	64	1	4	128	0,03125	1,03125	
	64	64	1	2	128	0,015625	1,015625		64	64	1	2	128	0,015625	1,015625		64	64	1	2	128	0,015625	1,015625	
	64	64	1	1	128	0,007812	1,007812		64	64	1	1	128	0,007812	1,007812		64	64	1	1	128	0,007812	1,007812	
	64	64	1	0,5	128	0,003906	1,003906		64	64	1	0,5	128	0,003906	1,003906		64	64	1	0,5	128	0,003906	1,003906	

FUNGO	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC AN-2 COMB	MIC AN-2 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI AN-02	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC NB-5 COMB	MIC NB-5 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI NB-05	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC NB-6 COMB	MIC NB-6 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI NB-06
4264	64	4	16	64	128	0,5	16,5	4,874511	16	4	4	64	128	0,5	4,5	2,374511	16	4	4	64	128	0,5	4,5	2,624511
	32	4	8	32	128	0,25	8,25		8	4	2	32	128	0,25	2,25		16	4	4	32	128	0,25	4,25	
	16	4	4	16	128	0,125	4,125		8	4	2	16	128	0,125	2,125		8	4	2	16	128	0,125	2,125	
	8	4	2	8	128	0,0625	2,0625		8	4	2	8	128	0,0625	2,0625		8	4	2	8	128	0,0625	2,0625	
	8	4	2	4	128	0,03125	2,03125		8	4	2	4	128	0,03125	2,03125		8	4	2	4	128	0,03125	2,03125	
	8	4	2	2	128	0,015625	2,015625		8	4	2	2	128	0,015625	2,015625		8	4	2	2	128	0,015625	2,015625	
	8	4	2	1	128	0,007812	2,007812		8	4	2	1	128	0,007812	2,007812		8	4	2	1	128	0,007812	2,007812	
	8	4	2	0,5	128	0,003906	2,003906		8	4	2	0,5	128	0,003906	2,003906		8	4	2	0,5	128	0,003906	2,003906	
6393	64	4	16	64	128	0,5	16,5	5,374511	64	4	16	64	128	0,5	16,5	5,624511	32	4	8	64	128	0,5	8,5	3,874511
	32	4	8	32	128	0,25	8,25		16	4	4	32	128	0,25	4,25		16	4	4	32	128	0,25	4,25	
	16	4	4	16	128	0,125	4,125		16	4	4	16	128	0,125	4,125		16	4	4	16	128	0,125	4,125	
	16	4	4	8	128	0,0625	4,0625		16	4	4	8	128	0,0625	4,0625		16	4	4	8	128	0,0625	4,0625	
	16	4	4	4	128	0,03125	4,03125		16	4	4	4	128	0,03125	4,03125		16	4	4	4	128	0,03125	4,03125	
	8	4	2	2	128	0,015625	2,015625		16	4	4	2	128	0,015625	4,015625		8	4	2	2	128	0,015625	2,015625	
	8	4	2	1	128	0,007812	2,007812		16	4	4	1	128	0,007812	4,007812		8	4	2	1	128	0,007812	2,007812	
	8	4	2	0,5	128	0,003906	2,003906		16	4	4	0,5	128	0,003906	4,003906		8	4	2	0,5	128	0,003906	2,003906	
4990	8	4	2	64	128	0,5	2,5	0,733886	2	4	0,5	64	128	0,5	1	0,272949	1	4	0,25	64	128	0,5	0,75	0,265136
	4	4	1	32	128	0,25	1,25		0,25	4	0,0625	32	128	0,25	0,3125		0,125	4	0,03125	32	128	0,25	0,28125	
	2	4	0,5	16	128	0,125	0,625		0,25	4	0,0625	16	128	0,125	0,1875		0,5	4	0,125	16	128	0,125	0,25	
	2	4	0,5	8	128	0,0625	0,5625		0,25	4	0,0625	8	128	0,0625	0,125		0,25	4	0,0625	8	128	0,0625	0,125	
	1	4	0,25	4	128	0,03125	0,28125		0,5	4	0,125	4	128	0,03125	0,15625		0,125	4	0,03125	4	128	0,03125	0,0625	
	1	4	0,25	2	128	0,015625	0,265625		0,5	4	0,125	2	128	0,015625	0,140625		1	4	0,25	2	128	0,015625	0,265625	
	1	4	0,25	1	128	0,007812	0,257812		0,5	4	0,125	1	128	0,007812	0,132812		0,5	4	0,125	1	128	0,007812	0,132812	
	0,5	4	0,125	0,5	128	0,003906	0,128906		0,5	4	0,125	0,5	128	0,003906	0,128906		1	4	0,25	0,5	128	0,003906	0,253906	
5731	4	2	2	64	128	0,5	2,5	0,937011	8	2	4	64	128	0,5	4,5	1,562011	4	2	2	64	128	0,5	2,5	0,812011
	2	2	1	32	128	0,25	1,25		4	2	2	32	128	0,25	2,25		1	2	0,5	32	128	0,25	0,75	
	1	2	0,5	16	128	0,125	0,625		1	2	0,5	16	128	0,125	0,625		1	2	0,5	16	128	0,125	0,625	
	2	2	1	8	128	0,0625	1,0625		2	2	1	8	128	0,0625	1,0625		1	2	0,5	8	128	0,0625	0,5625	
	1	2	0,5	4	128	0,03125	0,53125		2	2	1	4	128	0,03125	1,03125		1	2	0,5	4	128	0,03125	0,53125	
	1	2	0,5	2	128	0,015625	0,515625		2	2	1	2	128	0,015625	1,015625		1	2	0,5	2	128	0,015625	0,515625	
	1	2	0,5	1	128	0,007812	0,507812		2	2	1	1	128	0,007812	1,007812		1	2	0,5	1	128	0,007812	0,507812	
	1	2	0,5	0,5	128	0,003906	0,503906		2	2	1	0,5	128	0,003906	1,003906		1	2	0,5	0,5	128	0,003906	0,503906	

FUNGO	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC AN-2 COMB	MIC AN-2 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI AN-02	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC NB-5 COMB	MIC NB-5 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI NB-05	MIC FLZ COMB	MIC FLZ ALONE	RESULT ADO	MIC NB-6 COMB	MIC NB-6 ALONE	RESULT ADO	SOMA	MÉDIA FICI NB-06				
	8	4	2	64	128	0,5	2,5		4	4	1	64	128	0,5	1,5		8	4	2	64	128	0,5	2,5					
	4	4	1	32	128	0,25	1,25		2	4	0,5	32	128	0,25	0,75		4	4	1	32	128	0,25	1,25					
	2	4	0,5	16	128	0,125	0,625		2	4	0,5	16	128	0,125	0,625		4	4	1	16	128	0,125	1,125					
	2	4	0,5	8	128	0,0625	0,5625		2	4	0,5	8	128	0,0625	0,5625		4	4	1	8	128	0,0625	1,0625					
	2	4	0,5	4	128	0,03125	0,53125		2	4	0,5	4	128	0,03125	0,53125		4	4	1	4	128	0,03125	1,03125					
	2	4	0,5	2	128	0,015625	0,515625		2	4	0,5	2	128	0,015625	0,515625		4	4	1	2	128	0,015625	1,015625					
	2	4	0,5	1	128	0,0078125	0,5078125		2	4	0,5	1	128	0,0078125	0,5078125		4	4	1	1	128	0,0078125	1,0078125					
	2	4	0,5	0,5	128	0,00390625	0,50390625		0,8745117188	2	4	0,5	0,5	128	0,00390625		0,50390625	0,6870117188	4	4	1	0,5	128		0,00390625	1,00390625		
	22019	2	4	0,5	0,5	128	0,00390625		0,50390625	0,8745117188	2	4	0,5	0,5	128		0,00390625	0,50390625	0,6870117188	4	4	1	0,5		128	0,00390625	1,00390625	1,249511719