



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS DIADEMA**



**RAFAEL AUGUSTO MANTOVANI SILVA**

Investigação da atividade antifúngica de ésteres do ácido pirazinóico

**DIADEMA**

**2016**

RAFAEL AUGUSTO MANTOVANI SILVA

Investigação da atividade antifúngica de ésteres do ácido pirazinóico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Farmácia – Campus Diadema.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes

**DIADEMA**

**2016**

Silva, Rafael Augusto Mantovani  
Investigação da atividade antifúngica de ésteres do ácido pirazinóico /  
Rafael Augusto Mantovani Silva. –  
Diadema, 2016.  
51 f.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) –  
Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2016

Orientador: João Paulo dos Santos Fernandes

1. Ésteres do ácido pirazinóico 2. POA 3. Reposicionamento de fármacos 4. Atividade antifúngica. I. Título

CDD 615.19

RAFAEL AUGUSTO MANTOVANI SILVA

Investigação da atividade antifúngica de ésteres do ácido pirazinóico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Farmácia – Campus Diadema.

Diadema, 22 de Novembro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes  
Orientador

---

M<sup>a</sup> Michelle Fidelis Corrêa  
Avaliador 1

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Karen Spadari Ferreira  
Avaliador 2

Dedico este trabalho aos meus professores, grandes mestres da vida, que sempre me apoiaram, me incentivaram e acenderam em mim a chama e o prazer do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais José e Izabel e aos meus familiares por todo apoio, suporte e incentivo que foram essenciais à mim durante essa longa jornada de 6 anos de UNIFESP. Eles me ensinaram a lição mais valiosa de todas: Dedique-se e faça o melhor que puder para desenvolver aquilo que se propôs a fazer, o que sem dúvida, foi um diferencial e me ajudou no desenvolvimento desse trabalho.

Ao grande professor e orientador, Prof. Dr. João Paulo, o meu MUITO OBRIGADO! Obrigado por toda a ajuda, suporte moral e científico, paciência e ensinamentos, que sem dúvidas me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Você sem dúvidas é um dos melhores professores desta instituição e transmite todo o amor à profissão através de suas palavras e aulas geniais.

À professora doutora Karen Spadari Ferreira pela disponibilidade em fazer os testes necessários para avaliar a atividade biológica das moléculas sintetizadas neste trabalho.

Aos grandes amigos feitos durante a graduação, Leticia Mendes, Amanda Isis, Juliana Hiromi, Jéssica Tanaka, Gabriela Calvo, Maythê Cancian, Victor Amorim, Mariana Moreira, Giovana Bomentre, Tathiany Torres, Thaís Lourenço, Jéssica Figueiredo, Letícia Eiras, Nathalia Fischer, Aline de Jesus, Matheus Raffo, Ericka Félix, Bruno Anderson e muitos outros que, com certeza exerceram um papel importante no meu desenvolvimento acadêmico e me ajudaram nos vários momentos críticos da graduação.

À equipe do LINS, Marina, Álefe, Michelle, Profa Dani, Gabi, Tampa, Lisa, Fernanda, Cebola, entre outros que me ajudaram nas etapas iniciais do desenvolvimento do trabalho.

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a minha companheira da vida e grande amor Franciele por todo apoio durante esse período caótico da minha vida. Muito obrigado pelos conselhos, pelas revisões ortográficas, opiniões sinceras e acima de tudo, por estar ao meu lado sempre! MUITÍSSIMO obrigado, o seu apoio fez e faz muita diferença.

“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz homens sábios e a humildade faz grandes homens” – *Mahatma Gandhi.*

## RESUMO

Estima-se que cerca de um bilhão de pessoas, de todas as partes do mundo, sofram de infecções fúngicas. Apesar do elevado número de pacientes diagnosticados com infecções fúngicas, há um número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento destes pacientes. O reposicionamento de fármacos possibilita a utilização de um fármaco já extensamente estudado, em outra indicação que não a original. Os ésteres do ácido pirazinóico possuem atividade contra micobactérias, possivelmente por uma melhor penetração na parede celular deste organismo que o ácido pirazinóico (POA). O trabalho teve como objetivo sintetizar ésteres do ácido pirazinóico através de reações de alcoólise do cloreto de pirazinoíla em etapa única e avaliar a atividade antifúngica destes análogos de POA em espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*), pois apresentam uma prevalência de infecções alta em seres humanos e, assim, um impacto socioeconômico importante. Quatro ésteres pirazinoatos (metila, etila, isopropila e butila) foram sintetizados com rendimentos entre 20 e 80%, e adequadamente caracterizados por RMN. Os resultados mostraram que alguns ésteres do ácido pirazinóico apresentaram atividade antifúngica na escala de micromolar, apresentando valores de  $IC_{50}$  entre 165-280  $\mu$ M, em especial, os compostos pirazinoato de etila e pirazinoato de isopropila que apresentaram as melhores atividades antifúngica. A espécie mais sensível aos compostos foi *C. albicans*, enquanto a mais resistente, *C. tropicalis*. Conclui-se que POA e seus ésteres constituem-se como novos protótipos para o desenvolvimento de moléculas mais ativas contra fungos.

Palavras-chave: Ésteres do ácido pirazinóico. POA. Reposicionamento de fármacos. Atividade antifúngica.

## ABSTRACT

It is estimated that about 1 billion people, from all over the world, suffer from fungal infections. Despite the high number of patients diagnosed with fungal infections, there are a limited number of drugs available for the treatment of these patients. The repositioning of drugs allows the use of a drug already extensively studied, in another indication than the original one. The esters of pyrazinoic acid have activity against mycobacteria, possibly through a better penetration into the cell wall of this organism than pyrazinoic acid (POA). The aim of this work was to synthesize esters of pyrazinoic acid through alcoholization reactions of pyrazinoyl chloride in a single step and to evaluate the antifungal activity of these POA analogues in *Candida* species (*C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*) as they present a high prevalence of infections in humans and, thus, a significant socioeconomic impact. Four pyrazinoate esters (methyl, ethyl, isopropyl and butyl) were synthesized in yields of between 20 and 80%, and suitably characterized by NMR. The results showed that some esters of pyrazinoic acid showed antifungal activity on the micromolar scale, with IC<sub>50</sub> values between 165-280  $\mu$ M, especially the compounds pyrazinoate of ethyl and pyrazinoate of isopropyl which presented the best antifungal activities. The most sensitive species to the compounds was *C. albicans*, whereas the more resistant species, *C. tropicalis*. It is concluded that POA and its esters constitute as new prototypes for the development of molecules more active against fungi.

Keywords: Pyrazinoic acid esters. POA. Drug repositioning. Antifungal activity.

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                    | 8         |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                         | 11        |
| <b>2.1. Fungos</b> .....                                      | <b>11</b> |
| <b>2.2. Micoses</b> .....                                     | <b>12</b> |
| 2.2.1. <i>Candidíase</i> .....                                | 14        |
| <b>2.3. Alvos farmacológicos</b> .....                        | <b>17</b> |
| 2.3.1. <i>Membrana plasmática</i> .....                       | 188       |
| 2.3.2. <i>Parede celular</i> .....                            | 22        |
| 2.3.3. <i>Síntese de ácidos nucléicos</i> .....               | 23        |
| 2.3.4. <i>Outros alvos</i> .....                              | 25        |
| <b>2.4. Reposicionamento de fármacos</b> .....                | <b>26</b> |
| <b>3. METODOLOGIA</b> .....                                   | 31        |
| <b>3.1. Síntese dos compostos</b> .....                       | <b>32</b> |
| <b>3.2. Ensaio de atividade antifúngica</b> .....             | <b>33</b> |
| <b>3.3. Procedimentos Experimentais</b> .....                 | <b>33</b> |
| 3.3.1. <i>Obtenção do pirazinoato de metila (2)</i> .....     | 33        |
| 3.3.2. <i>Obtenção do pirazinoato de etila (3)</i> .....      | 34        |
| 3.3.3. <i>Obtenção do pirazinoato de isopropila (4)</i> ..... | 35        |
| 3.3.4. <i>Obtenção do pirazinoato de n-butila (5)</i> .....   | 36        |
| 3.3.5. <i>Ensaio biológico</i> .....                          | 37        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                        | 39        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....                                     | 44        |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                    | 45        |

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos fármacos disponíveis como opções para o tratamento de micoses como anfotericina B, cetoconazol e mais recentemente alilaminas e triazóis estarem sendo usados, devido a algumas características, estes têm seu uso dificultado. Muitos destes fármacos são tóxicos, devido à baixa toxicidade seletiva, pois as células fúngicas e humanas possuem mecanismos de síntese e crescimento parecidos. Apresentam também aspectos fungistáticos (apenas inibem o crescimento) e não fungicidas, levando assim a reinfecções ou ao desenvolvimento rápido de formas de resistência à esses antifúngicos (DEBONO et al., 1994)

Os fungos possuem mecanismos de síntese de proteínas e ácidos nucleicos semelhantes aos seres humanos. Nos últimos 25 anos, as infecções fúngicas têm se tornado mais frequentes em consequência de seu papel como patógenos oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Assim, o desenvolvimento de um novo fármaco antifúngico tem se mostrado muito desafiador, pois existem poucos alvos específicos para fungos que não trariam efeito deletério para a espécie humana. Deste modo, se faz necessário investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas que tenham um amplo espectro de ação, maior toxicidade seletiva. (RABINOW et al., 2007).

Uma análise de 68 medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) levou a uma conclusão de que, em média, leva-se 15 anos e US\$ 800 milhões para se introduzir um novo fármaco no mercado americano. Concluiu-se também que mesmo duplicando o valor investido em pesquisa e desenvolvimento de novos compostos (US\$ 27 bilhões), o número de novos medicamentos aprovados permanece constante em 20-30 compostos por ano (CHONG, SULLIVAN, 2007).

O reposicionamento de fármacos (do inglês *Drug Repositioning*) é a estratégia empregada na busca de novas indicações para fármacos já comercializados ou compostos que já foram amplamente caracterizados e estudados. Essa estratégia tem um apelo muito grande, pois seus candidatos passaram previamente por estágios de testes pré-clínicos, clínicos, toxicológicos, farmacocinéticos e outros. Adicionalmente, há também informações sobre a estabilidade, síntese em larga escala e fabricação (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2016). Esta estratégia permite a economia de tempo e dinheiro gastos nas etapas de pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas (ARONSON, 2010).

Micobactérias e fungos são microrganismos que apresentam características semelhantes, tais como crescimento lento e uma parede celular rica em moléculas lipídicas. Recentemente, estudos revelaram que essas semelhanças se estendem para diversas características, particularmente relativas a patogenicidade (WILLCOCKS; WREN, 2014).

Semelhante aos fungos, mas diferente da maioria das bactérias, as micobactérias são capazes de sintetizar trealose e inositol. A trealose é um componente chave do dimicolilato de trealose (TDM), constituinte importante da parede celular, que tem grande influência na virulência das micobactérias. O TDM é importante porque confere uma proteção contra a desidratação, estresse oxidativo, ação de antimicrobianos e antibióticos, e inibe a maturação de fagossomas, bem como induz a aglomeração, característica similar a um biofilme. Observa-se também que as micobactérias utilizam a manose para compor os glicolípídios como lipoarabinomananas e fosfatidil inositol, componentes da parede celular que também afetam a virulência, assim como a maioria dos fungos que tem a manose como um dos principais componentes de sua parede celular (WILLCOCKS; WREN, 2014).

A identificação de alvos que podem ser prevalentes entre os fungos e micobactérias podem render novas alternativas para a identificação de alvos para o desenvolvimento de novos fármacos além dos já existentes, como por exemplo, a inibição das enzimas do citocromo P450 dos fungos. Essas enzimas são ubíquas, ou seja, estão em grandes quantidades nos fungos e sabe-se que também estão presentes em *M. tuberculosis*, deixando-as suscetíveis a ação de compostos azólicos (WILLCOCKS; WREN, 2014). Entretanto, enzimas do CYP450 estão também presentes em humanos, o que pode levar a efeitos tóxicos (TORTORA et al., 2009).

A pirazinamida (PZA) foi desenvolvida como um análogo da nicotinamida e foi usada no início do século 20 como tratamento de infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição da enzima FAS-I (ácido graxo sintetase-1). Sabe-se também que a pirazinamida pode agir, pelo menos parcialmente, como pró-farmaco. Esta molécula é ativada pela enzima pirazinamidase, presente nas células de *Mycobacterium tuberculosis*, em ácido pirazinóico que, dentro da célula é capaz de causar a morte das células fúngicas por mecanismos ainda não totalmente elucidados (ZHANG, 2009).

Mendez e colaboradores (2009) propuseram que o efeito da inibição da FAS-I pela PZA em micobactérias poderia ser estendido a outros microorganismos. Assim, estudaram a

ação da PZA nas formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania major* e observaram uma inibição da proliferação tanto das formas amastigotas e promastigotas.

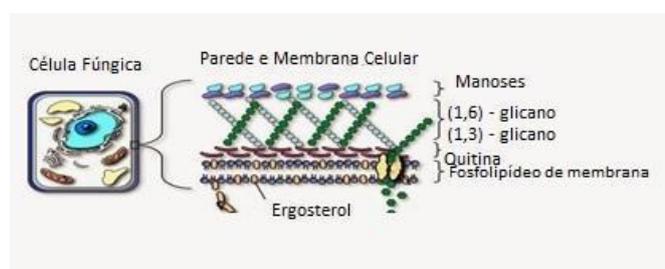
Considerando que a PZA pode ter ação em outros microrganismos, e a semelhança entre fungos e micobactérias, este trabalho teve como objetivo sintetizar e avaliar a atividade antifúngica de uma série de ésteres do ácido pirazinóico (que tem reconhecida ação contra micobactérias), preliminarmente em fungos do gênero *Candida*, para identificar uma nova molécula-líder para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fungos

Fungos são microrganismos eucariontes e heterótrofos, de vida livre, podendo ser encontrados em uma variedade grande de habitats como água doce, salgada, solo, gravetos, alimentos, plantas, animais e homens. Podem ser classificados baseando-se no número e disposição das células. Os fungos podem apresentar-se como seres unicelulares ou multicelulares, sendo que os primeiros são classificados como leveduras, enquanto que os últimos podem apresentar vários núcleos, e suas células são dispostas em forma tubular contínua (denominada hifa), sendo classificados como fungos filamentosos. Fungos que podem apresentar as duas morfologias, segundo as condições nutricionais e de temperatura, classificados como dimórficos. O diformismo é importante característica para os fungos patogênicos, principalmente àqueles que podem causar infecções sistêmicas. Estes podem apresentar-se na forma miceliar fora do hospedeiro e leveduriforme dentro deste. Quando está na forma leveduriforme, por ser unicelular, é capaz de se espalhar por todo o corpo através da corrente sanguínea. Porém, quando está na forma miceliar, consegue espalhar-se melhor para aumentar sua eficácia na captação de nutrientes (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010; TORTORA, et al., 2005; TRABULSI, 2008).

A célula fúngica é revestida por uma parede celular complexa, composta principalmente por quitina, polímeros de açúcar e glicoproteínas (manoses complexas) e é responsável por dar forma rígida e força mecânica às células. A quitina é um polissacarídeo linear composto por unidades de N-acetilglicosamida unidas por ligações  $\beta$  (1-4) e é o suporte fundamental da parede celular. Os polímeros de açúcar são  $\beta$ - (1-3)-D-glicano e  $\beta$ - (1-6)-D-glicano e estão ligados covalentemente a quitina. Já as glicoproteínas (manoses complexas) estão ligadas covalentemente a quitina e aos  $\beta$  -glicanos (FARKAS, 2003; GOLAN et al., 2009).



**Figura 1:** Estrutura celular geral dos fungos (Fonte: Adaptado de Blog Questão de Saúde).

## 2.2. Micoses

As infecções causadas por fungos são chamadas de micoses. São classificadas, dependendo de sua ação no hospedeiro, como superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. Existem também as micoses oportunistas. (TORTORA et al., 2005 ; TRABULSI, 2008).

As micoses superficiais são causadas por fungos encontrados na pele e tecidos de revestimento (TORTORA et al., 2005). As ceratofitoses, exemplo de micoses superficiais, atingem apenas camadas superficiais da epiderme e dos pelos, mas não tem atividade queratolítica, e provocam reação de hipersensibilidade. Exemplos de ceratofitoses são Pitiríase versicolor, a Tinea nigra e a Tricomiose nodosa. A pitiríase versicolor é uma infecção causada pelo fungo *Malassezia furfur* e manifesta-se como lesões descamativas do tronco, membros superiores e, mais raramente, rosto. Caracteriza-se com manchas hipo ou hiperocrômicas, de contornos arredondados. Os pacientes que apresentam essa infecção podem apresentar prurido em casos de excesso de sudorese. A *tinea nigra* é uma infecção assintomática, causada pelo fungo *Hortaea werneckii* e caracteriza-se pelo aparecimento de manchas escuras (marrons ou negras), não descamativas e de contorno nítido com bordas bem definidas, porém irregulares na região das palmas das mãos, plantas dos pés e mais raramente no dorso do pé, pescoço e tórax. Já a tricomiose nodosa é causada pelo fungo *Corynebacterium tenuis* e apresenta-se pela infecção de pelos axiais e genitais, adquirindo diferentes cores dependendo da associação com bactérias cromogênicas (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Micoses cutâneas são aquelas que atingem todo o estrato córneo da pele ou a parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal. (TRABULSI, 2008). São classificadas essencialmente como dermatofitoses e são causadas por fungos dermatófitos que secretam enzimas queratinases que irão degradar a queratina presente nas unhas, epiderme e fios de cabelo do hospedeiro e também promover reações inflamatórias. São causadas por fungos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (TORTORA et al., 2005; TRABULSI, 2008). Sua via de transmissão pode ser direta ou indireta. As principais fontes de transmissão são animais, solo e homem. Um exemplo de dermatofitose é a *tinea manum*, causada pela infecção localizada nas mãos do hospedeiro, pelo fungo *T. Mentagrophytes* (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

As micoses subcutâneas são causadas por fungos saprófitas que atingem os tecidos abaixo da pele. Sua transmissão se dá através da implantação direta dos esporos ou fragmentos de micélios devido a perfuração da pele. Em alguns casos (entomofotoromicose), a transmissão se dá através da deposição de esporos na mucosa nasal após a inalação destes (TADANO et al., 2005). O *Sporothrix schenckii* é um exemplo de fungo causador de micoses subcutâneas (TORTORA et al., 2005).

Já as micoses sistêmicas podem infectar tanto hospedeiros sadios ou imunodeprimidos (predominantemente), invadindo o organismo via sistema respiratório e, a partir daí, podem disseminar-se para qualquer órgão. *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus*, são agentes de micoses sistêmicas (TORTORA et al., 2005). O *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da paracoccidioidomicose, uma infecção fúngica sistêmica que acomete primeiramente os pulmões, podendo se espalhar por outros órgãos do hospedeiro. A infecção é causada pela inalação dos conídios do fungo que, já nos pulmões, transformam-se na sua forma levedureforme podendo assim espalhar-se por todo corpo (NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS, 2009). As complicações causadas pela paracoccidioidomicose dependem do local infectado. Quando os pulmões estão infectados, as complicações geradas são dispnéia, fadiga e dor no peito. Já quando atinge o sistema linfático, pode gerar linfodemas principalmente no pescoço e axilas. A paracoccidioidomicose pode infectar também as mucosas, causando ulcerações na boca e nariz, principalmente (NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS, 2009).

A histoplasmose é uma infecção causada pelo fungo *H. capsulatum* e se dá através da inalação de microconídios do fungo, presentes em fezes de pássaros, galinhas ou morcegos. Geralmente, é uma infecção assintomática em indivíduos imunocompetentes e se não há imunodrepressão, as infecções agudas podem ser curadas com a ação do sistema imune do hospedeiro. Entre as principais complicações causadas pela histoplasmose estão histoplasmose pulmonar aguda, histoplasmose pulmonar subcutânea, nódulos pulmonares, granuloma mediastial e histoplasmose ocular (WHEAT et al., 2016).

A criptococose é uma micose sistêmica que é adquirida inalando os esporos dos fungos da família *Cryptococcus sp.* Atualmente, é causada por duas principais espécies, *Cryptococcus neoformans*, que é de característica oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular e *Cryptococcus gattii*, micose primária de hospedeiro

aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Ambas causam meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não, de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros. A mortalidade por criptococose é estimada em 10% nos países desenvolvidos chegando a 43% nos países em desenvolvimento como a Tailândia em um tempo médio de sobrevivência de 14 dias (KON, 2008).

Por último, as micoses oportunistas são àquelas causadas por fungos que, em seu habitat natural ou na presença de hospedeiros imunocompetentes, não apresentam patogenicidade, mas quando infectam indivíduos imunocomprometidos, acabam tornando-se patogênicos. É a principal micose que acomete pacientes em situação de risco, em condição de internação hospitalar, HIV-positivos e transplantados. (SGARBI; BARBEDO, 2010)

O gênero *Aspergillus* pertence à família Trichocomaceae, e foi catalogado pela primeira vez em 1729, pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Michel, e possui mais de 150 espécies, incluindo 20 patogênicas. Esses fungos são aeróbicos e encontrados em ambientes ricos em oxigênio, crescendo geralmente na superfície do local onde vivem. (CARVALHO, 2013)

A aspergilose é uma micose oportunista causada predominantemente pelo fungo *Aspergillus fumigatus* que pode atingir coração, olhos, medula óssea e cérebro. É especialmente crítica em pacientes imunocomprometidos e por isso é uma micose de extrema importância clínica. Além disso, é considerada a maior responsável pela mortalidade de pacientes que passaram por transplante de pulmão. Sua principal característica, porém, é a sua capacidade de desenvolver resistência aos fármacos disponíveis para tratamento. O *Aspergillus fumigatus* apresenta resistência a antifúngicos azólicos, poliênicos e equinocandínicos, o que demonstra que seu mecanismo de resistência ainda não é conhecido e também mostra a grande necessidade do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos mais eficientes (OLIVEIRA, 2008).

### 2.2.1. Candidíase

O fungo *Candida sp* é constituído por aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, que habitam locais do corpo como cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes. Entre as espécies que compõem esse gênero, a *Candida*

*albicans* apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença (PICHOVÁ et al., 2001).

A *Candida albicans* é um dos patógenos oportunistas que mais são isolados nas mucosas de indivíduos. Sabe-se que estas estão adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica, ou seja, em indivíduos imunocompetentes. O balanço entre o hospedeiro e esse fungo é delicado e pode-se transformar em uma relação parasitária, com o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases. Essas infecções fúngicas variam desde lesões superficiais em pessoas saudáveis até infecções disseminadas em pacientes imunodeprimidos (ALVARES et al., 2007).

É fungo um dimórfico, que pode ter formas leveduriformes no estado saprofito, estando associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas, observadas em processos patogênicos. Além disso, sob condições de crescimento sub-ótimas, nesse fungo pode ocorrer formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos (ALVARES et al., 2007).

Clinicamente, a candidíase pode ser cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou visceral. O microrganismo cresce melhor em superfícies quentes e úmidas, causando frequentemente vaginite, dermatite das fraldas e candidíase oral. Essas infecções são as manifestações usuais da doença e, embora normalmente não apresentem ameaça à vida, representam um problema de considerável importância socioeconômica (ALVARES et al., 2007).

A candidíase pseudomembranosa é uma das formas mais comuns de candidíase, causada principalmente por *C. albicans*, que pode acometer pessoas de qualquer faixa etária, e especialmente em pessoas que apresentam alguma condição debilitante, portadoras de doenças crônicas, ou ainda lactentes. É uma infecção aguda, conhecida popularmente como "sapinho", e apresenta-se como placas de aspecto cremoso e coloração branco-perolada ou branco-azulada formadas, principalmente, por massas emaranhadas de hifas do fungo misturadas com epitélio descamado, queratina, fibrina, tecidos necrosados, bactérias e células inflamatórias (NETO et al., 2005).

A candidíase vulvovaginal é um distúrbio ocasionado pelo crescimento anormal leveduras, principalmente do gênero *Candida*, na mucosa do trato genital feminino, causado geralmente por um desbalanceio na microbiota local, tais como alteração no pH vaginal. Essa infecção pode ser desencadeada também em mulheres imunocomprometidas e lactantes. A candidíase vulvovaginal é uma infecção de vulva e vagina caracterizada por prurido, ardor, dispareunia e pela eliminação de um corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata de leite. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura (ALVARES et al., 2007).

Outro fungo da família *Candida* que apresenta importância clínica é *Candida tropicalis*. Esta é uma levedura dimófica diplóide que pode apresentar-se tanto na forma de brotamento (células elipsoidais) ou como pseudomicélio e tem a capacidade de se disseminar rapidamente em pacientes imunodeprimidos e causar alta mortalidade (CHAI et al., 2010). Dentre as características de *C. tropicalis*, a capacidade de formação de biofilme é a que mais se destaca, pois esta capacidade está diretamente relacionada ao seu fator de virulência. A *C. tropicalis*, em comparações a todas as espécies de *Candida*, apresenta a maior capacidade de formação de biofilme em catéteres centrais e de nutrição parenteral, aumentando assim os riscos de infecções à pacientes hospitalizados (CHAI et al., 2010).

A *C. tropicalis* representa de 3-66% de todas as *Candidas* isoladas na corrente sanguínea em todo o mundo e que, em muitos centros hospitalares, esta é a segunda *candida* mais isolada e essa variação de prevalência deve-se as diferenças geográficas. Estudos mostram que esta é a causadora de 12–25% casos de infecções em hospitais norte-americanos e de 20 – 24% em hospitais brasileiros (CHAI et al., 2010).

A *C. parapsilosis* está entre as espécies de *Candida* que mais causam doenças invasivas no mundo. Dentre as doenças que podem ser causadas por este fungo estão fungemia, endocardite, meningite, peritonite, artrites, onicomicoses, infecções auriculares, vulvovaginite e infecções do trato urinário. Suas células podem apresentar uma forma oval ou cilíndrica, e diferentemente da *C. albicans*, não forma hifas, mas sim pseudo-hifas (TROFA et al., 2008).

A capacidade de diferentes *C. parapsilosis* causarem infecções em vários tecidos pode também estar relacionada à habilidade de formação de biofilme, o que permite com que estes fungos possam se instalar em diversos utensílios médicos, incluindo catéteres central e

periférico, catéteres de hemodiálise e diálise peritoneal, valvas cardíacas protéticas, entre outros. Devido a presença da *C. parapsilosis* na pele humana, esta entra em contato com os utensílios médicos durante o uso destes pelo paciente, particularmente em ambientes hospitalares (TROFA et al., 2008).

### 2.3. Alvos farmacológicos

Os fungos e os seres humanos possuem mecanismos bioquímicos muito semelhantes, tais como produção de energia, síntese de proteínas e de ácidos nucleicos e até mesmo os mecanismos que são responsáveis pela divisão celular. Por estes motivos, existe uma dificuldade grande no desenvolvimento de agentes antifúngicos seletivos, ou seja, agentes que sejam tóxicos apenas aos fungos e não causem danos ao homem (GOLAN et al., 2009). Apesar das semelhanças, ainda existem diferenças que são usadas como alvos para obter ação antifúngica com toxicidade seletiva (LEMKE et al., 2008).

Os alvos que mais são estudados para a produção de novos antifúngicos são principalmente a síntese de ergosterol (principal componente da membrana celular dos fungos), a síntese da parede celular (agindo principalmente na síntese dos  $\beta$ -glicanos), a estabilidade da membrana plasmática (antifúngicos criam poros na membrana, desestabilizando-a) e a síntese de ácidos nucleicos (GOLAN et al., 2009).

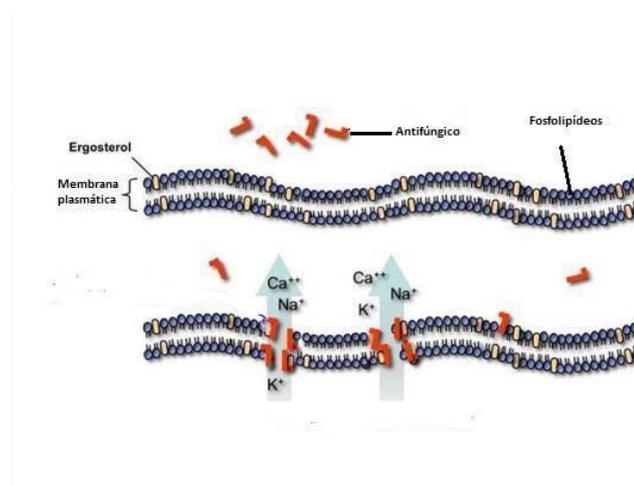


**Figura 2:** Representação dos principais alvos terapêuticos (Fonte: Adaptado de <http://farmacolog.dominiotemporario.com>)

### 2.3.1. Membrana plasmática

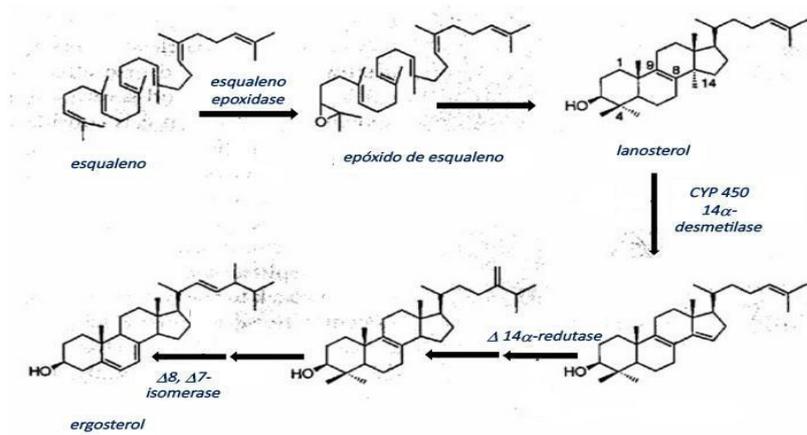
A membrana plasmática dos fungos é composta principalmente por ergosterol e fosfolípidos de membrana, o que permite a seletividade na entrada e saída de substâncias tais como íons (cálcio, sódio, potássio) e glicose, entre outras (TORTORA et al., 2005).

Os antifúngicos que interagem com membrana plasmática são capazes de criar poros nesta e assim promover a saída dessas substâncias, determinando assim o colapso da célula fúngica (componentes básicos para a criação de energia como o glicogênio é perdido) e além disso, propicia também a entrada de outras moléculas indesejadas, tais como outros fármacos que ajudarão na morte celular (GOLAN et al., 2009).

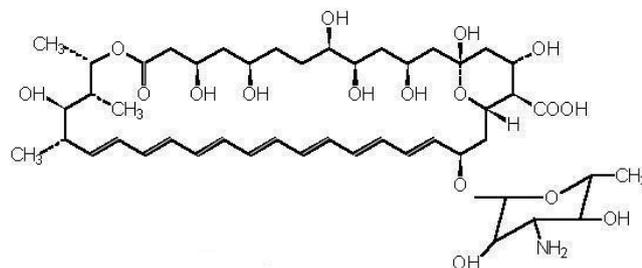


**Figura 3:** Representação da ação de um antifúngico desestabilizante de membrana (Fonte: Adaptado de <http://2.bp.blogspot.com/>)

O ergosterol é o principal componente da membrana plasmática das células fúngicas. Apesar de ser um composto análogo ao colesterol (componente da membrana plasmática de células animais), sua síntese compreende etapas diferentes e por este motivo ele é tido como um alvo para terapia antifúngica. Sua biossíntese inicia-se com a conversão do esqualeno em esqualeno epóxido, pela esqualeno epoxidase. O esqualeno epóxido sofre então uma ciclização, tornando-se lanosterol que é a primeira molécula esteróide da biossíntese do ergosterol. Assim, o lanosterol sofre uma desmetilação (perde o grupo 14- $\alpha$ -metil) pela ação de uma enzima do citocromo P-450, a  $\alpha$ -14-dimetilase e, após outras sucessivas ações de enzimas redutases e isomerases, é convertido em ergosterol, concluindo assim a biossíntese (LEMKE et al., 2008).



**Figura 4:** Síntese do Ergosterol (Fonte: Adaptado de <http://slideplayer.com.br/slide/291738/>)



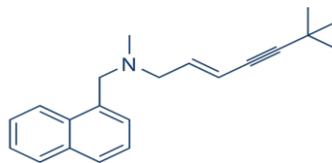
**Figura 5:** Estrutura molecular da anfotericina B

Os antibióticos poliênicos são agentes antifúngicos macrolídicos, que apresentam uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica. A região hidrofílica contém diversas hidroxilas, um ácido carboxílico e usualmente, uma molécula de açúcar. A região lipofílica contém, em parte, um conjunto de 3 a 7 ligações duplas conjugadas. Esse número de ligações duplas conjugadas está diretamente ligado à sua ação antifúngica e, inversamente ligada a toxicidade em células de mamíferos. Entre os principais fármacos que representam essa classe, estão a anfotericina B (figura 5) e a nistatina, que foram desenvolvidos em meados da década de 50 (LEMKE et al., 2008).

A anfotericina B é derivada de espécies de *Streptomyces* e durante décadas foi tida como única opção para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Seu mecanismo de ação se dá por meio da ligação com o ergosterol presente na membrana celular, criando poros ou canais que alteram assim a sua permeabilidade, fazendo com que substâncias essenciais, tais como íons e pequenas moléculas orgânicas (glicose) sejam extravasadas, levando assim a morte celular. É um fármaco extremamente tóxico e seu uso é indicado para o tratamento de

micoses sistêmicas, em situações onde outros tratamentos não obtiveram o efeito desejado, deixando assim a vida do paciente em risco. Causa diversos eventos adversos como febre, calafrios, hipotensão e severa nefrotoxicidade, fazendo com que sua escolha como tratamento seja feita com muita cautela (LEMKE et al., 2008).

Atualmente, duas principais enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol têm sido usadas como alvo de terapia antifúngica. O bloqueio da conversão de esqualeno em epóxido de esqualeno se dá através do bloqueio da ação da enzima esqualeno epoxidase. Essa é uma das vias utilizadas como alvo de moléculas antifúngicas, pois é o primeiro passo propriamente dito da biossíntese de ergosterol. As etapas anteriores a esta são comuns à biossíntese de colesterol em células mamíferas e seriam também atingidas por uma possível molécula antifúngica. Portanto, sua utilização poderia gerar diversos eventos adversos em humanos. Já o bloqueio da desmetilação do lanosterol em 4,4-dimetilcolestatrienol se dá através da inativação da enzima 14- $\alpha$ -desmetilase. Com o bloqueio da síntese do ergosterol, é possível desestabilizar a membrana celular dos fungos, comprometendo sua integridade e sua capacidade de captar nutrientes, levando assim a uma inibição do crescimento celular dos fungos (NOBRE et al., 2001).

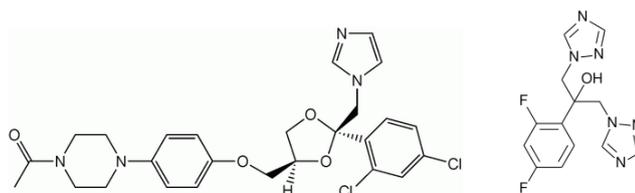


**Figura 6:** Estrutura molecular da terbinafina.

As alilaminas são agentes antifúngicos sintéticos que inibem a ação da enzima esqualeno epoxidase, diminuindo a quantidade total de ergosterol presente na membrana plasmática, levando a uma alteração físico-química desta membrana. Essa desestabilização leva a um mal funcionamento de proteínas de transportes ligadas ao transporte de nutrientes e também ao balanço de pH. Outro fato decorrente a inibição desta enzima é o acúmulo de hidrocarboneto esqualeno que é tóxico aos fungos quando estão em altas concentrações plasmáticas. Estas ações contribuem para a morte celular dos fungos. Estes agentes são usados principalmente para o tratamento de infecções fúngicas tópicas, como onicomicose (LEMKE et al., 2008).

A terbinafina (figura 6) é o antifúngico mais empregado da classe, pois além de ser efetivo contra uma variedade grande de fungos dermatófitos, está disponível tanto na forma tópica quanto oral. É um fármaco altamente lipofílico e tem como propriedade única, a alta efetividade no tratamento de onicomicoses (infecções nas unhas), pois quando é administrada por via oral é distribuída, através do plasma, para as unhas, atingindo assim o sítio da infecção, tornando-a assim muito superior a outros fármacos usados no tratamento de onicomicoses. É metabolizado por diversas enzimas CYP450 e por esse motivo, o uso concomitante de fármacos que inibam alguma dessas enzimas não afeta o *clearance* geral do fármaco. Entretanto fármacos como a cimetidina, que inibem diversas enzimas CYP450, podem aumentar a disponibilidade da terbinafina no plasma (LEMKE et al., 2008).

Apesar da enzima 14-  $\alpha$  -desmetilase estar presente em diversos organismos como mamíferos, fungos e protozoários, esta apresenta diversas isoformas e, graças ao processo evolutivo, as isoformas se modificaram nas diferentes classes de organismos, gerando enzimas com baixa identidade sequencial (aproximadamente 30%), levando assim à criação de terapias seletivas, como por exemplo, a criação dos azóis que agem na isoforma presente em fungos (SUETH-SANTIGAGO et al., 2015).



**Figura 7:** Estrutura molecular do cetoconazol e do fluconazol.

Os compostos azólicos são antifúngicos mais abundantes no mercado farmacêutico com cerca de 20 fármacos representantes. Têm como mecanismo de ação a inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, levando ao acúmulo de 14-alfa-metilesteróis. Este acúmulo gera modificações na permeabilidade da membrana fúngica, na atividade de enzimas ligadas à membrana (ATPase e enzimas de transporte de elétrons), na síntese de quitina, inibindo assim o crescimento do fungo. São divididos em compostos imidazólicos (possuem um núcleo azólico contendo 2 nitrogênios) ou triazólicos (possuem um anel azólico com 3 nitrogênios) (MAERTENS, 2004 ; LEMKE et al., 2008).

A inibição cruzada, pelos azóis, de enzimas dependentes do citocromo P-450 envolvidas na síntese de cortisol e de testosterona em células do homem, leva a eventos

adversos importantes. Sendo assim, o efeito mais observado é na supressão da síntese de testosterona, causando ginecomastia, oligospermia, perda da libido e impotência sexual. Esse efeito adverso é observado principalmente como os imidazóis de uso sistêmico (cetoconazol), mas os compostos triazóis, especificamente os de 2ª geração, são menos tóxicos porque apresentam uma afinidade 1000 vezes maior pelas enzimas P-450 fúngicas, nas concentrações terapêuticas indicadas. Cerca de 5% dos pacientes podem apresentar manifestações alérgicas como rash cutâneo, prurido e eosinofilia, além de distúrbios gastrointestinais (náuseas e vômitos) e cefaléia. Os azóis de uso sistêmico são teratogênicos, assim não é recomendado seu uso durante a gestação nem durante a amamentação, pois estes são eliminados pelo leite (GOLAN et al., 2009).

A amorolfina é um antifúngico da classe das morfolinas e tem como mecanismo de ação a inibição da síntese do ergosterol, promovendo a inibição do crescimento e a morte celular. É indicada para o tratamento tópico de micoses superficiais, tais como onicomicoses causadas por fungos do gênero *Tinea*, como *T. rubrum*. Os principais eventos adversos relacionados ao uso da amorolfina são coceira, irritação, vermelhidão e sensação de ardência nas unhas (FELDSTEIN et al, 2015).

### 2.3.2. Parede celular

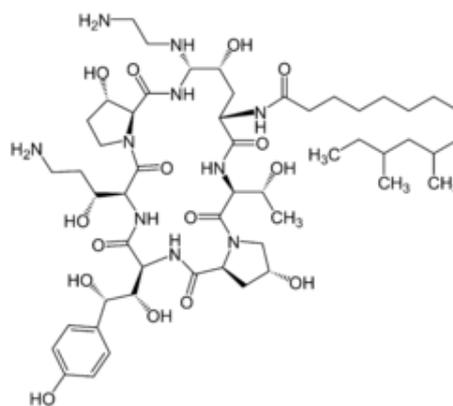
A parede celular dos fungos não é apenas uma estrutura rígida e inerte, mas dinâmica e responsável por diversas funções como transporte de macromoléculas, proteção osmótica, crescimento, conjugação entre outros. Por esse motivo, qualquer alteração em sua organização ou metabolismo pode levar a uma interrupção do crescimento celular dos fungos (TORTORA et al., 2005).

Os polipetídeo glicanos ( $\beta$ -(1-3) e  $\beta$ -(1-6) D-glicanos) são os principais constituintes da parede celular e por esse motivo são usados como alvos para terapia antifúngica. Essas glicoproteínas são cadeias de manoses linearmente ligadas por ligações  $\beta$ -(1-6) e  $\beta$ -(1-3), que passam por processos de N-glicosilação ou O-glicosilação (dependendo do resíduo o sacarídeo é ligado) no complexo de golgi da célula. Fármacos que inibem esse processo de glicosilação conseguem consequentemente inibir a síntese das glicoproteínas e, assim, inibir o crescimento da parede celular (DEBONO et al., 1994).

As equinocandinas são agentes antifúngicos que inibem a síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glicanos, que são glicoproteínas presentes na parede celular. Assim, as equinocandinas inibem

a síntese da parede celular, levando a uma ruptura da integridade desta e, conseqüentemente, estresse osmótico, lise celular e por fim, morte do fungo (LEMKE et al., 2008 ; GOLAN et al., 2009).

O principal fármaco representante da classe é a caspofungina, que é um lipopeptídeo semissintético, sintetizado a partir do produto de fermentação de *Glarea lozoyensis* (BRUNTON et al., 2013) Esta representa a primeira classe de antifúngicos com um novo mecanismo de ação descoberto em mais de 30 anos e tem uma contribuição grande no tratamento de micoses sistêmicas (LEMKE et al., 2008).



**Figura 8:** Estrutura molecular da caspofungina

A caspofungina é efetiva contra uma variedade de tipos de *Candida* e *Aspergillus*. Portanto, é considerado uma alternativa viável e que salva vidas de pacientes infectados com fungos resistentes. Devido ao metabolismo hepático limitado, interações com outros fármacos não são um problema a ser considerado. Está disponível no mercado apenas na apresentação intravenosa, pois na forma oral é inativa (LEMKE et al., 2008). Os efeitos adversos mais freqüentes causados pela caspofungina são: febre, reações relacionadas à infusão intravenosa, dor de cabeça, náusea, aumento na atividade das transaminases hepáticas e reações alérgicas (CORTES; RUSSI, 2011).

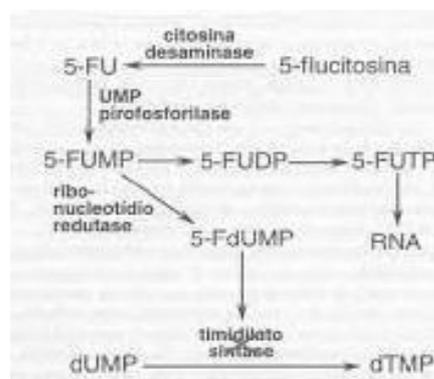
### 2.3.3. Síntese de ácidos nucleicos

A síntese de ácidos nucleicos também pode ser usada como alvo da terapia antifúngica, pois esta apresenta algumas particularidades nos fungos. Como exemplo, estes organismos contém a enzima citidina desaminase específica que reage com seu substrato, a citidina, para gerar um metabólito essencial ao fungo, a uridina (LEMKE et al., 2008). A uridina, agregada

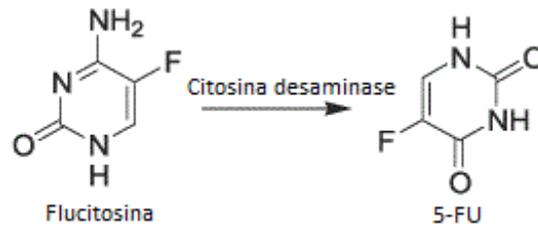
a uma molécula de glicose (uridina difosfato-glicose), é o substrato usado para o alongamento da cadeia dos  $\beta$ -glicanos, através da enzima glicana  $\beta$ -(1-3) sintetase (FUKUDA et al., 2009)

A flucitosina, também conhecida como 5-fluorcitosina, é uma pirimidina fluorada e tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de ácido nucleico dos fungos. Sua ação se dá através da formação da 5-fluorouracila (5-FU), que promove inibição da timidilato sintase, resultando na inibição da síntese de DNA e da divisão celular. Inicialmente a flucitosina é captada seletivamente pelas células fúngicas através de permeases específicas de citosina (expressas apenas em membranas de fungos). Já no interior da célula, a flucitosina é convertida em 5-FU e em reações subsequentes em ácido 5-fluordesoxiuridílico (5-FdUMP) que irá se ligar a enzima timidilato sintase, promovendo assim a inibição da síntese de DNA. Apesar das células humanas não expressarem a citosina permease, bactérias presentes na microbiota intestinal expressam e, por este motivo, acabam fazendo a conversão da flucitosina em 5-FU, levando assim a eventos adversos indesejados. Os eventos adversos mais comuns ao uso da flucitosina são náuseas, vômitos, diarreias. Em pacientes nos quais os níveis séricos do fármaco atingem níveis altos, eventos como leucopenia e trombocitopenia, aumento das enzimas hepáticas e da fosfatase alcalina podem ser observados (LEMKE et al., 2008; BRUNTON et al., 2013; GOLAN et al., 2009).

É tipicamente usada em associação com a anfotericina B em infecção fúngicas sistêmicas, pois quando usado isoladamente, verifica-se um rápido desenvolvimento de resistência devido a mutações na citosina permease dos fungos (GOLAN et al., 2009).



**Figura 9:** Mecanismo de ação da flucitosina



**Figura 10:** Conversão da Flucitosina em 5-fluoruracila pela ação da enzima citosina desaminase.

#### 2.3.4. Outros alvos

O ácido undecilênico é um ácido graxo monoinsaturado, encontrado naturalmente no corpo (suor). Possui capacidade antifúngica conhecida há anos e é comumente usado em formulações antifúngicas tópicas OTC (*over-the-counter*), para tratamento principalmente de dermatomycoses como a candidíase. Seu mecanismo de ação parece estar associado a inibição da morfogênese da *Candida albicans*, através da inibição da transformação da levedura em sua forma de hifas. Doses relativamente baixas do ácido undecilênico têm mostrado um potencial antifúngico grande e as dosagens necessárias para atingir a dose terapêutica parecem ser relativamente seguras. Pode causar irritação cutânea, em contato com a pele ou mucosas (THORNE, 2002).

Ciclopirox-olamina é um agente antifúngico sintético, com amplo espectro de ação e de uso tópico usado no tratamento de oncomycoses, candidíases cutâneas, infecções cutâneas no pé e dermatite seborréica. O ciclopirox-olamina tem como mecanismo de ação proposto a receptação de compostos essenciais e pode alterar a permeabilidade da membrana de células fúngicas em altas concentrações (ESCARRONE, 2006).

Os efeitos adversos relacionados ao uso do ciclopirox-olamina, para o tratamento de micoses superficiais são raros, sendo o fármaco bem tolerado. Porém, os eventos adversos mais reportados são ardência na pele, irritação, vermelhidão, dor e prurido (ESCARRONE, 2006).

Os benzoatos tiveram sua atividade antifúngica descrita há mais de 100 anos, e devido a essa capacidade, têm sido extensamente usados na preservação de alimentos ácidos, tais como sumos de fruta, pickles, vinho e preparações farmacêuticas (KREBS et al., 1983).

O ácido benzóico é menos utilizado que seu sal devido à baixa hidrossolubilidade. É um ácido orgânico fraco e suas moléculas não dissociadas são as responsáveis pela atividade

antimicrobiana, sendo essa maior em pH baixos. Em pH 3,0, por exemplo, o composto apresenta-se 93,5% não dissociado e em pH 4,0, apenas 59,3%. O  $pK_a$  do ácido benzóico é aproximadamente 4,19 (KAWASE, 2008).

Kim e colaboradores (2010) descreveram que a atividade antifúngica do ácido benzóico varia de acordo com as substituições em sua estrutura. Para tal, apresentaram a síntese de vários derivados do ácido benzoico substituídos no anel aromático nas posições 2, 3 e 4. Foi observado que a atividade antifúngica dessas moléculas aumentou com a mudança dos grupos metila, metoxila ou cloro da posição 2 para a posição 4 do anel aromático. Alternativamente, a atividade antifúngica de análogos do ácido hidroxibenzóico foi a oposta ao apresentado anteriormente. Nestes, a mudança dos grupos metila, metoxila ou cloro da posição 2 para a posição 4 do anel aromático diminuiu a atividade antifúngica. Entretanto, a adição de grupos hidroxila no anel aromático diminuiu a atividade relativa do ácido benzóico não-substituído. Testes com os análogos ácidos 4-metil, 4-metoxi e 4-clorobenzóico mostraram, em contrapartida, que atividade antifúngica foi maior do que o ácido benzóico não-substituído.

Os parabenos são ésteres do ácido 4-hidroxibenzóico que apresentam amplo espectro de atividade e boa solubilidade em água, sendo que estas características variam de acordo com o tamanho da cadeia carbônica substituinte do éster. São os conservantes mais utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas, sendo metilparabeno e propilparabeno, seus principais representantes (FERNANDES et al., 2012).

O mecanismo de ação dos parabenos ainda é desconhecido. Acredita-se que estes apresentam ação sobre a síntese de DNA e RNA, sobre enzimas-chave como ATPases e fosfotransferases ou também sobre os mecanismos de transporte pela membrana (FERNANDES et al., 2012).

#### **2.4. Reposicionamento de fármacos**

As indústrias farmacêuticas enfrentam um problema significativo: o *output*, ou a descoberta de novas moléculas, não têm acompanhado o crescimento de gastos com pesquisa e desenvolvimento. Esse problema se mantém mesmo com o investimento no descobrimento de novas tecnologias como design de estruturas de fármacos, química combinatória e *high throughput screening* (HTS). Esse problema fez com que as grandes empresas começassem a

procurar novas formas de uso e/ou versões melhoradas de fármacos já existentes (ASHBURN; THOR, 2004).

Cerca de 2000 compostos estão sem utilização em grandes empresas farmacêuticas após não terem sido aprovados nas fases II ou III, onde aproximadamente 50% destes compostos tiveram seus testes interrompidos devido a problemas de eficácia no alvo originalmente proposto (TARTAGLIA, 2006). Estima-se também que cerca de 9000 moléculas estão sem patente e disponíveis para investigação (ARONSON, 2006).

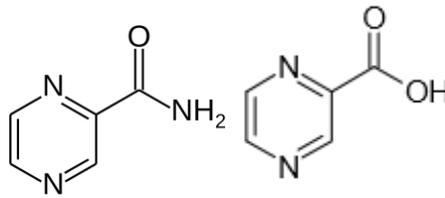
Estima-se que um estudo clínico de fase 4 custa em torno de U\$ 100 milhões, impossibilita a implementação de estudos adequados, em países sem uma infraestrutura de saúde adequada. Fármacos já existentes foram submetidas a estudos extensos, incluindo testes clínicos de fase 4 em milhões de pacientes, garantindo assim sua segurança e eficácia. Assim, é razoável inferir que o reposicionamento de fármacos promove não só economia no tempo, mas também no custo, que é o principal objetivo das indústrias de medicamentos (CHONG; SULLIVAN, 2007).

O reposicionamento de fármacos (do inglês *Drug Repositioning*) é a estratégia empregada na busca de novas indicações para fármacos já comercializados ou compostos que já foram amplamente caracterizados e estudados. Essa estratégia tem um apelo muito grande, pois seus candidatos passaram previamente por estágios de testes pré-clínicos, clínicos, toxicológicos, farmacocinéticos e outros. Adicionalmente, há também informações sobre a estabilidade, síntese em larga escala e fabricação (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2016).

Existem alguns exemplos de reposicionamento de fármacos usados hoje como alternativa terapêutica. O nifurtimox era usado originalmente para tratamento da doença de Chagas e atualmente é usado para o tratamento da tripanossomíase africana, mais conhecida como doença do sono ou HAT. Outro exemplo a ser citado é a eflornitina, que tinha como proposta original o tratamento de câncer, porém após estudos, descobriu-se que também pode ser usado para o tratamento da doença do sono (HAT). A anfotericina B também é um exemplo de reposicionamento. É usada principalmente para tratamento de infecções fúngicas, mas também pode ser usada para o tratamento de leishmaniose (ASHBURN; THOR, 2004).

A pirazinamida, análogo sintético da nicotinamida, foi descoberta durante pesquisas sobre a atividade inibitória da nicotinamida em *M. tuberculosis*, sendo sintetizada primeiramente em 1936, mas seu potencial tuberculostático só foi reconhecido em 1952, 16

anos após ser sintetizada pela primeira vez (ZHANG et al., 2003). É usada principalmente no tratamento de tuberculose causada por *M. tuberculosis*.



**Figura 11:** Estruturas molecular da pirazinamida e do ácido pirazinóico

Seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado. Um possível mecanismo de ação da pirazinamida e do ácido pirazinóico é a inibição da enzima ácido graxo sintetase tipo I (FAS-I). A FAS-I é essencial para a sobrevivência da célula, pois é responsável pelo alongamento dos ácidos micólicos presentes na parede celular. Esse alongamento ocorre pela condensação sequencial de acetil-coenzima A e malonil-CoA (NGO, 2006). Alguns estudos demonstraram que tanto a pirazinamida como o ácido pirazinóico ligam-se à FAS-I, em sítios diferentes (ALMEIDA, 2011; FERNANDES, 2006).

Sabe-se também que a pirazinamida atua, pelo menos parcialmente, como um pró-farmaco que é convertido em sua forma ativa, o ácido pirazinóico, pela enzima pirazinamidase/nicotinamidase, enzima esta codificada pelo gene *pncA* de *M. tuberculosis*. A pirazinamida entra por difusão passiva na célula alvo e é convertida em ácido pirazinóico pela enzima PZase citoplasmática. Após a conversão, o ácido pirazinóico sai da célula, também por difusão passiva e, se o pH extracelular for ácido, uma pequena porção é protonada e assim entra facilmente pela membrana celular novamente, causando a morte da *M. tuberculosis* por diversos mecanismos tais como interrupção do transporte de íons da membrana, inibição da biossíntese de pantotenato e coenzima A responsáveis pela produção de ATP, e outros mecanismos ainda não descobertos (ZHANG et al., 2003). Uma pequena parte da pirazinamida, quando utilizada por via oral, é metabolizada no fígado em ácido pirazinóico e, por isso, já é descrita como um dos fármacos com potencial hepatotóxico (ZHANG, 2010).



colaboradores (2013) também sintetizaram o pirazinoato de 2-cloroetila como antimicobacteriano, e verificaram que esse composto apresentou atividade muito promissora. Em um trabalho posterior, Fernandes e colaboradores (2016) analisaram a influência do meio de cultura utilizado no crescimento das culturas de *M. tuberculosis*, na atividade nos ésteres do ácido pirazinóico. Verificaram que todos os ésteres de ácido pirazinóico testados apresentaram uma atividade menor em *M. tuberculosis* que foram cultivadas utilizando o meio 7H12 (meio rico em proteína) se comparados com as cultivadas no meio GAS (sal de glicerol-alanina). Entretanto, todos os ésteres apresentaram atividade na ordem de concentração micromolar neste último meio, sendo superior à atividade da própria PZA.

Sendo assim, o trabalho teve como objetivo sintetizar e avaliar a atividade antifúngica de ésteres do ácido pirazinóico em leveduras do gênero *Candida*.

### 3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

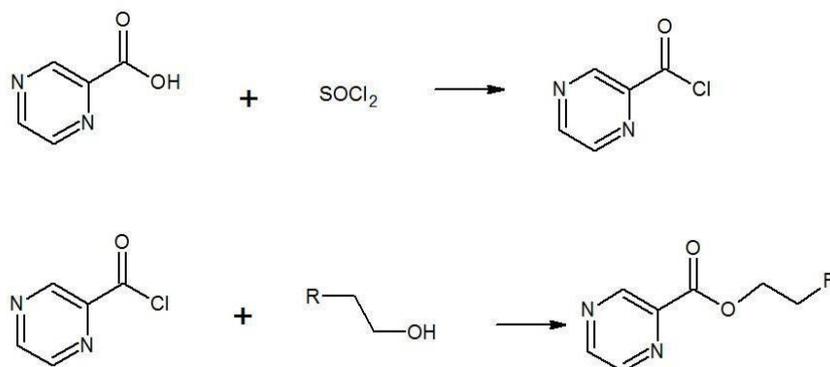
A procura por novas alternativas na terapia antifúngica tem se tornado cada vez mais necessária devido ao aumento de infecções antifúngicas, principalmente em populações imunodeficientes (RABINOW et al., 2007). O planejamento de fármacos é uma alternativa viável à ser explorado, pois possibilita o desenvolvimento de novos fármacos e pró-fármacos que possam contribuir para uma melhora na terapia antifúngica atual.

Considerando que a pirazinamida (e possivelmente o ácido pirazinóico) podem apresentar atividade em outros microrganismos e sua estrutura é semelhante ao ácido benzóico, que tem atividade antifúngica conhecida, e diferenciando entre si apenas no anel aromático (LEMKE et al., 2008), a proposta explorada nesse trabalho concerne à utilização de pró-fármacos do ácido pirazinóico, já que este é a forma ativa da pirazinamida em micobactérias. Por apresentar características hidrofílicas e ser facilmente ionizável, o ácido pirazinóico pode apresentar dificuldades para atravessar a parede celular dos fungos, pois esta é muito hidrofóbica (FERNANDES, 2006; ZHANG, 2002). Sendo assim, sintetizaram-se ésteres do ácido pirazinóico com o objetivo de aumentar a lipofilicidade da molécula, tentando assim aumentar seu poder de penetração na parede celular e então avaliar sua possível atividade antifúngica em cepas de fungos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Síntese dos compostos

Foram sintetizados 4 ésteres de ácido pirazinóico (pirazinoatos de metila, etila, isopropila e *n*-butila) através da reação deste com cloreto de tionila para obter o respectivo cloreto de pirazinoíla, conforme proposto por Fernandes (2006) e Segretti et al. (2016). A seguir, o cloreto de pirazinoíla reage, no mesmo ambiente reacional, com uma hidroxila alcoólica, resultando assim no éster correspondente. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas cromatográficas de sílica gel com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, utilizando mistura de acetato de etila:hexano (1:6) como fase móvel. Os produtos finais foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária. Amostras dos pirazinoato de 2-cloroetila (**6**) e o pirazinoato de 2-(pirazinoiloxi)etila (**7**) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes para a realização dos ensaios de atividade antifúngica.



**Figura 13:** Esquema de obtenção dos ésteres do ácido pirazinóico deste trabalho.

Os compostos obtidos tiveram sua estrutura molecular confirmada por métodos espectroscópicos adequados, tais como ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H-RMN) e carbono-13 (<sup>13</sup>C-RMN), operando a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, e utilizano o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os espectros obtidos para compostos já reportados foram comparados com dados de literatura.

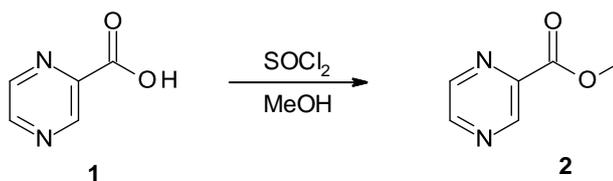
## 4.2. Ensaios de atividade antifúngica

A atividade antifúngica dos compostos foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira, do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da Unifesp.

A metodologia usada para o ensaio foi a microdiluição dos compostos em placas de 96 poços, contendo fungos das espécies *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilopsis*. Os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento (IC<sub>50</sub>) dos microrganismos foi determinado estatisticamente usando o software Graphpad Prism 5 através de regressão não-linear dos valores de densidade ótica (DO) a 550 nm após a adição do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A anfotericina B foi utilizada como padrão de referência para a atividade antifúngica.

## 4.3. Procedimentos Experimentais

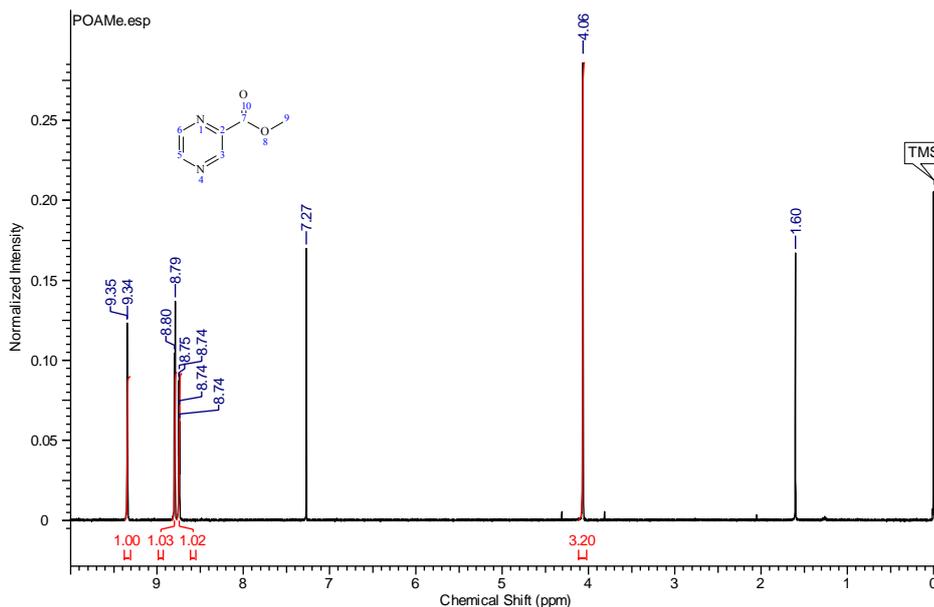
### 4.3.1. Obtenção do pirazinoato de metila (2)



**Figura 14:** Síntese do pirazinoato de metila

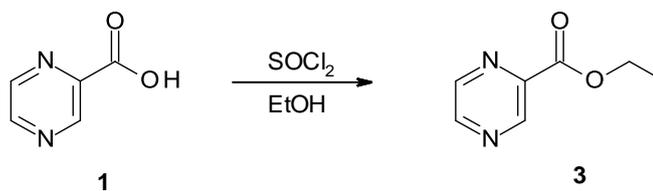
Em um balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 2 mmol de ácido pirazinóico (0,248g) e 5 mL de metanol. Sob agitação, adicionou-se 0,2 mL de cloreto de tionila à solução, e permitiu-se reagir *overnight* à temperatura ambiente. A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida, e ao resíduo obtido adicionou-se 5 mL de acetato de etila. A solução obtida foi lavada com 3x5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada, secada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado.

*Pirazinoato de metila (2)*: rendimento 78 %. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ = ppm) 4,06 (s, 3H), 8,74 (dd, *J* = 2,4, 1,5 Hz, 1H), 8,79 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 9,34 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ = ppm) 53,3, 143,3, 144,4, 146,4, 147,8, 164,4. Os dados espectrais estão de acordo com relato prévio de literatura (SEGRETTEI et al., 2016).



**Figura 15:** Espectro de RMN de hidrogênio do composto **2**.

#### 4.3.2. Obtenção do pirazinoato de etila (**3**)



**Figura 16:** Síntese do pirazinoato de etila

Em um balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 2 mmol de ácido pirazínico (0,248g) e 5 mL de etanol. Sob agitação, adicionou-se 0,2 mL de cloreto de tionila à solução, e permitiu-se reagir *overnight* à temperatura ambiente. A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida, e ao resíduo obtido adicionou-se 5 mL de acetato de etila. A solução obtida foi lavada com 3x5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada, secada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado.

*Pirazinoato de etila (3)*: rendimento 67 %.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta = \text{ppm}$ ) 1,47 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 4,53 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 8,75 (dd,  $J = 2,4, 1,4$  Hz, 1H), 8,78 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 9,33 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta = \text{ppm}$ ) 14,3, 62,5, 143,6, 144,4, 146,3, 147,7, 164,0. Os dados espectrais estão de acordo com relato prévio de literatura (SEGRETTI et al., 2016).

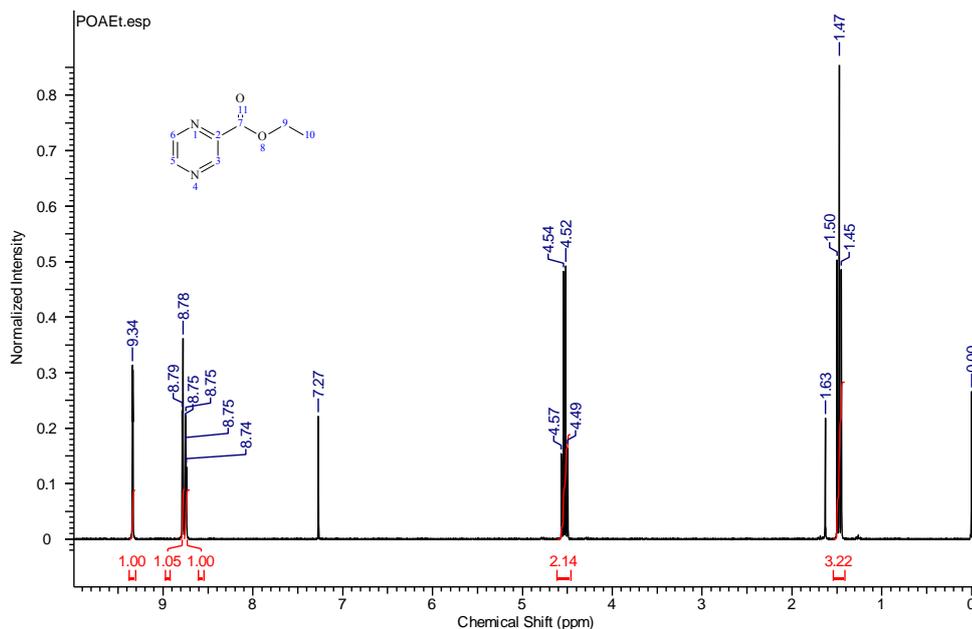


Figura 17: Espectro de RMN de hidrogênio do composto 3.

#### 4.3.3. Obtenção do pirazinoato de isopropila (4)

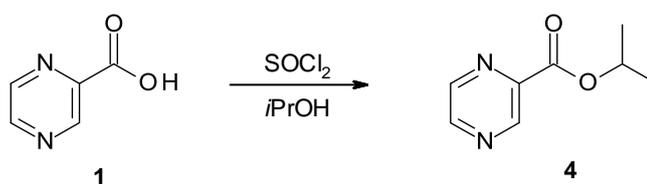
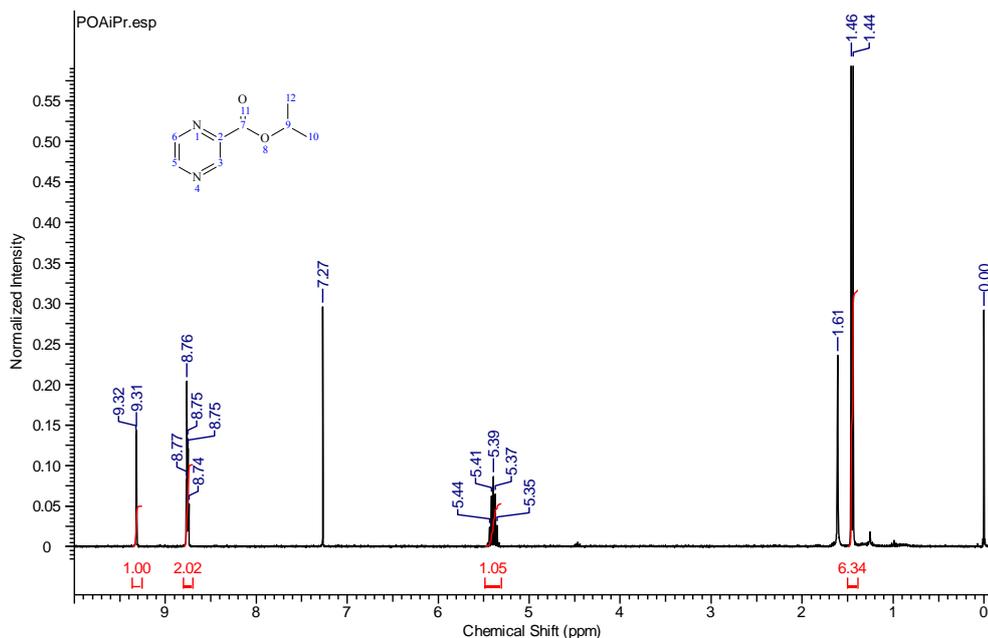


Figura 18: Síntese do pirazinoato de isopropila

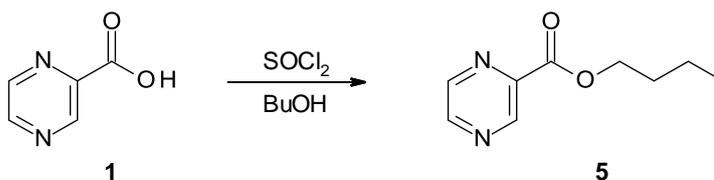
Em um balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 2 mmol de ácido pirazinóico (0,248g) e 5 mL de isopropanol. Sob agitação, adicionou-se 0,2 mL de cloreto de tionila à solução, e permitiu-se reagir *overnight* à temperatura ambiente. A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida, e ao resíduo obtido adicionou-se 5 mL de acetato de etila. A solução obtida foi lavada com 3x5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada, secada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado.

*Pirazinoato de isopropila (4)*: rendimento 20 %.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  = ppm) 1,45 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 6H), 5,39 (sept,  $J$  = 6,3 Hz, 1H), 8,74-8,78 (m, 2H), 9,31 (d,  $J$  = 1,5 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  = ppm) 21,8, 63,0 143,6, 144,5, 146,3, 147,5, 164,0.



**Figura 19:** Espectro de RMN de hidrogênio do composto **4**.

#### 4.3.4. Obtenção do pirazinoato de *n*-butila (**5**)

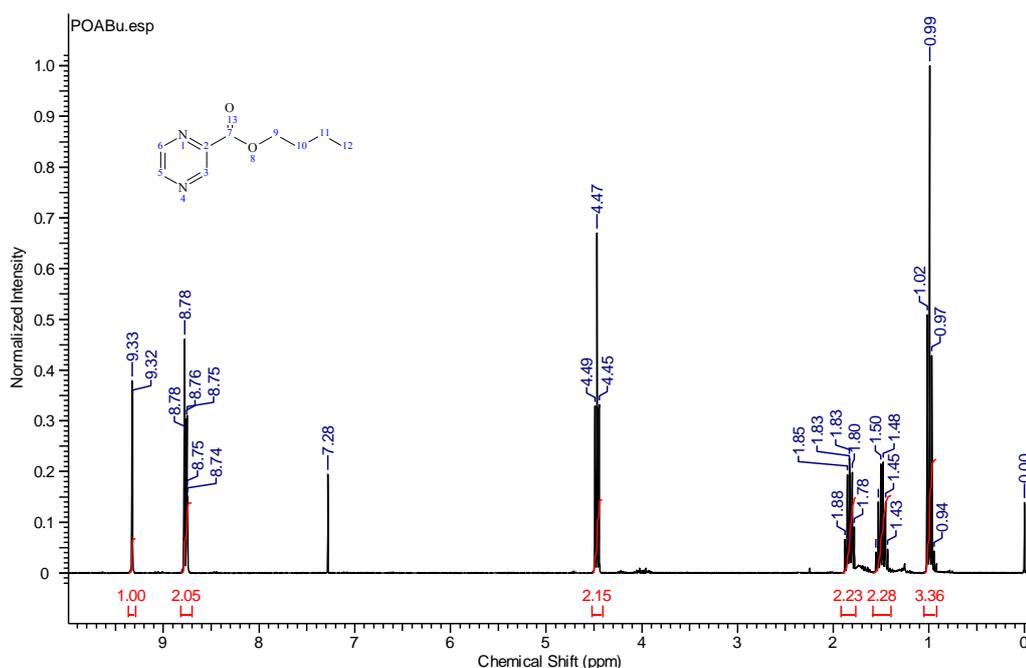


**Figura 20:** Síntese do pirazinoato de *n*-butila

Em um balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 2 mmol de ácido pirazinóico (0,248g) e 5 mL de *n*-butanol. Sob agitação, adicionou-se 0,2 mL de cloreto de tionila à solução, e permitiu-se reagir *overnight* à temperatura ambiente. A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida, e ao resíduo obtido adicionou-se 5 mL de acetato de etila. A solução obtida foi lavada com 3x5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada, secada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado.

*Pirazinoato de n-butila (5)*: rendimento 79 %.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta =$  ppm) 0,99 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 1,49 (sext,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,77-1,88 (m, 2H), 4,47 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 8,75 (dd,  $J = 2,4, 1,2$  Hz, 1H), 8,78 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 9,32 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta =$  ppm) 13,7, 19,2, 30,6, 66,3, 143,6, 144,5, 146,3, 147,6,

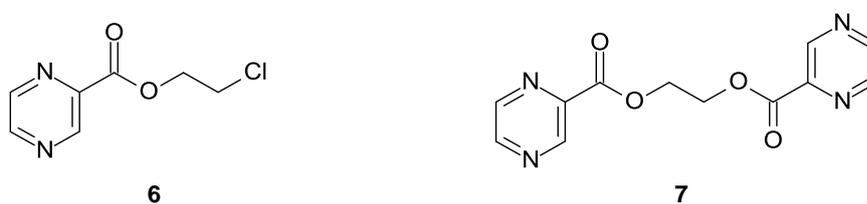
164,0. Os dados espectrais estão de acordo com relato prévio de literatura (SIMÕES et al., 2009).



**Figura 21:** Espectro de RMN de hidrogênio do composto **5**.

#### 4.3.5. Ensaio biológico

Os inóculos das leveduras foram preparados a partir da concentração de  $2,5 \times 10^3$  leveduras/mL, sendo estas diluídas em meio RPMI 1640. A anfotericina B, utilizada como padrão, foi avaliada em concentrações de 1 a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Os compostos-teste sintetizados e os compostos cedidos (tabela 2 e figura 22) foram analisados nas seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 22:** outros ésteres avaliados.

Foi utilizado o método de microdiluição para a realização dos testes de suscetibilidade aos compostos. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do inóculo de levedura em cada poço da placa de 96 orifícios mais os compostos em estudo. Após 48 horas, verificou-se o crescimento das leveduras observando a turvação do meio, comparado ao grupo controle.

Para análise da capacidade antifúngica dos compostos, a atividade metabólica das leveduras foi analisada pelo método de MTT (ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio, que produz cristais formazana azul-escuros e insolúveis dentro das células). Estes cristais foram determinados espectrofotometricamente a 550 nm (FREIMOSER et al., 1999).

Os experimentos foram realizados em triplicata e as DO obtidas analisadas estatisticamente. Com base nos valores de DO, foram construídas curvas dose-resposta para cada composto, e os valores da concentração inibitória do crescimento fúngico em 50% (IC<sub>50</sub>) foram calculados utilizando o software GraphPad Prism 5. Os valores de IC<sub>50</sub> são apresentados na tabela 2, em unidade micromolar.

#### 4.3.6. *LogP*

O logP de POA (1) dos compostos (2) a (7) foram calculados utilizando o software MarvinBeans, versão 16.8.1.0, e são apresentados na tabela 2. O software usa metodologia de cálculo que se baseia no método de Viswanadhan e colaboradores, e complementado com dados de cálculo pelo método de Klopman e da base de dados Physprop (FERNANDES et al., 2016). As concentrações-padrão de eletrólitos incluídas no cálculo (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) foram 0,1 M.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ésteres de ácido pirazinóico **2-5** apresentados aqui foram obtidos, em sua maioria, com bons rendimentos, exceto para o composto **4** (20%).

As preparações de ésteres podem ser feitas por diversas abordagens. No geral, reações de esterificação são catalisadas por ácidos, mas na ausência de ácidos fortes, se desenvolvem muito lentamente. Porém, quando são adicionadas pequenas quantidades de ácidos fortes, HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por exemplo, alcançam o equilíbrio em poucas horas. Como o ponto de equilíbrio controla a quantidade de éster formado, o uso de um excesso do ácido carboxílico ou do álcool aumenta o rendimento baseado no reagente limitante (SOLOMONS; FRYHLE 2009).

Um dos principais métodos para obtenção de ésteres é a esterificação de Fischer. É uma reação catalisada por ácidos, entre um ácido carboxílico e álcool, dando como produto um éster e água. Esta reação ocorre em equilíbrio entre reagentes e produtos. Por ser uma reação que ocorre em equilíbrio, sua vantagem é a possibilidade de controlar o rendimento da produção de éster reagindo o ácido carboxílico ou o álcool em excesso. Alternativamente, pode-se retirar a água para que a reação ocorra no sentido de formação de mais produto para que o equilíbrio volte a se estabelecer, aumentando assim a formação de ésteres. Uma de suas limitações está na necessidade do uso de um catalisador ácido, que é um dos fatores determinantes para a velocidade da reação. Outra limitação é o impedimento estérico, pois grupos muito volumosos próximos ao sítio de reação, tanto no componente álcool quanto no componente ácido, reduzem a velocidade das reações significativamente. Os álcoois terciários, por exemplo, reagem tão lentamente em esterificações catalisadas por ácido que eles normalmente, ao contrário, sofrem eliminação (SOLOMONS; FRYHLE 2009).

Reações de substituição nucleofílica também são uma alternativa para obtenção de ésteres (SOLOMONS; FRYHLE 2009). Cynamon e colaboradores (1995) propuseram a síntese de ésteres de ácido pirazinóico em duas etapas, sendo a primeira a síntese do cloreto de pirazoila e, a segunda, a etapa de alcoólise. Resultados mostraram que na primeira etapa obtiveram-se rendimentos de 70-80 % e na segunda, 60-90 %. O rendimento final ficou em torno de 50%. Já Fernandes e colaboradores (2009), sintetizaram ésteres de ácido pirazinóico reagindo haletos de alquila e carboxilatos, através de reações de substituição nucleofílica. No referido trabalho, os compostos pirazinoato de etila e pirazinoato de hexila foram sintetizados com rendimentos de 62-76%, que foram melhores se comparados aos resultados obtidos por Cynamon e colaboradores (1995). A vantagem desse método utilizado foi a possibilidade de

se fazer uma reação de etapa única, pois os haletos de alquila foram gerados *in situ* utilizando DBU ou trietilamina. A desvantagem na abordagem de Cynamon e colaboradores (1995), frente à abordagem realizada por Fernandes e colaboradores (2009), é o uso de derivados alcoólicos na reação. Sabe-se que álcoois muito volumosos apresentam ponto de evaporação elevado, dificultando o processo de evaporação. Já os haletos de alquila, utilizados na abordagem de Fernandes e colaboradores (2009) são compostos mais voláteis, permitindo assim que sua evaporação seja facilitada.

Para sintetizar os compostos apresentados neste trabalho, utilizou-se um método desenvolvido pelo nosso grupo (FERNANDES et al., 2013), onde se realizam reações de ácido pirazinóico com cloreto de tionila em meio ao solvente alcoólico. O método utilizado foi eficaz na síntese dos compostos pirazinoato de metila, pirazinoato de etila e 1-butila, pois estes apresentaram rendimento de 78 %, 67 % e 79 %, respectivamente. Porém, este método se mostrou ineficaz para a síntese do pirazinoato de isopropila, onde rendimento de apenas 20% foi obtido, possivelmente pelo maior impedimento estereoquímico devido à cadeia lateral ramificada.

**Tabela 1:** Rendimentos comparativos entre metodologias.

| Compostos | Cynamon et al. (1995)   | Fernandes e Felli (2009) | Fernandes et al. (2016) |
|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>2</b>  | 50% (rendimento global) | 76%                      | 78%                     |
| <b>3</b>  | 50% (rendimento global) | -                        | 67%                     |
| <b>4</b>  | -                       | -                        | 20 %                    |
| <b>5</b>  | -                       | -                        | 79%                     |

É possível verificar que os compostos foram corretamente obtidos pela avaliação dos espectros de  $^1\text{H-RMN}$ . Os sinais referentes à cadeia lateral dos ésteres foram observados em todos os espectros. Para o composto **2**, o sinal de deslocamento 4,06 ppm refere-se aos hidrogênios metílicos. Já no composto **3**, os sinais triplete em 1,47 ppm e o quarteto em 4,53 ppm caracterizam o grupo etila. O grupo isopropila presente no composto **4** pode ser confirmado através dos sinais em 1,45 ppm (dubleto) e 5,39 ppm (septeto), dos hidrogênios metínico e metílicos, respectivamente. Por fim, o composto butílico **5** pode ser confirmado pela presença dos sinais em 0,99 ppm, 1,48 ppm, 1,83 ppm e 4,47 ppm.

Observando os resultados da tabela 1, nota-se que os rendimentos obtidos na utilização do método proposto neste trabalho foram superiores ou semelhantes aos

rendimentos obtidos pelo método proposto por Cynamon e colaboradores (1995) e Fernandes e colaboradores (2009), respectivamente. A vantagem do método utilizado neste trabalho é que foi uma única etapa de reação, levando à economia de energia e solventes, bem como um rendimento geral superior ao obtido por Cynamon e colaboradores (1995). Foi possível utilizar esse método em uma única etapa, pois o nitrogênio presente no anel pirazínico pode agir como base para extinguir o HCl formado durante a reação, dispensando assim o uso de bases como piridina ou trietilamina (FERNANDES et al., 2013).

**Tabela 2:** Valores de IC<sub>50</sub> calculados para os compostos apresentados neste trabalho e os respectivos valores de logP calculados.

| Compostos      | IC <sub>50</sub> µg/mL ±SD (µM) |                      |                        | logP  |
|----------------|---------------------------------|----------------------|------------------------|-------|
|                | <i>C. albicans</i>              | <i>C. tropicalis</i> | <i>C. parapsilosis</i> |       |
| 1              | 34,7 ±0,32 (280)                | 31,79 ±0,92 (256)    | 29,44 ±0,42 (237)      | -0,42 |
| 2              | 30,16 ±0,32 (218)               | n.d. (>289)          | n.d. (>289)            | -0,27 |
| 3              | 25,2 ±0,23 (165)                | n.d. (>262)          | <25 (<164; 25%*)       | 0,08  |
| 4              | 29,99 ±0,13 (180)               | 28,26 ±0,74 (170)    | 29,58 ±0,34 (177)      | 0,50  |
| 5              | n.d. (>221)                     | n.d. (>221)          | n.d. (>221)            | 1,05  |
| 6              | 34,72 ±0,31 (186)               | n.d. (>214)          | 25,04 ±0,24 (134)      | 0,39  |
| 7              | n.d. (>145)                     | n.d. (>145)          | n.d. (>145)            | -0,72 |
| Anfotericina B | 2 (2)                           | 3 (3)                | 2 (2)                  |       |

\* % inibição do crescimento na concentração apresentada.

n.d.: não determinado (inativo)

O potencial antifúngico de ácidos benzóicos já é conhecido (KREBS et al., 1983). Existem vários trabalhos na literatura que demonstram a atividade de ácidos benzoicos em várias espécies de fungos (FARIA et al., 2015; KIM et al., 2010; KIM et al., 2008b). Kim e colaboradores (2008) mostraram que o ácido benzóico apresenta atividade antiúngica em cepas de *Aspergillus* da ordem de concentração milimolar. Posteriormente, prepararam derivados substituídos no anel aromático com os grupos metila, metoxila, ou cloro nas posições 2, 3 e 4, e observaram que os compostos 4-substituídos tiveram a melhor atividade antifúngica, possivelmente pelo aumento da lipofilicidade das moléculas. Entretanto, quando o grupo hidroxila é o substituinte, a atividade é maior quando presente na posição 2 do anel aromático.

Os resultados obtidos permitem verificar que o POA (**1**) apresentou atividade antifúngica contra *Candida* spp. entre 230-280  $\mu\text{M}$ , comparável aos dados da literatura para o ácido benzoico (100-730  $\mu\text{M}$ ) (FARIA et al., 2015). Em um trabalho publicado recentemente, Faria e colaboradores (2015) avaliaram a atividade de derivados do ácido benzoico em várias espécies de *Candida*. *C. parapsilosis* ( $\text{IC}_{50}$  90-130  $\mu\text{M}$ ) parece ser mais sensível à ação antifúngica do ácido benzoico do que a espécie *C. albicans*. A espécie *C. tropicalis* apresentou maior resistência ( $\text{IC}_{50}$  480  $\mu\text{M}$ ). Outro trabalho (KIM et al., 2010) demonstrou a atividade antifúngica do ácido benzoico em *Aspergillus*, obtendo valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 2500-6000  $\mu\text{M}$ . Até onde alcança nosso conhecimento, este é o primeiro relato da atividade do POA em *Candida*, e assim o mecanismo da ação antifúngica é ainda desconhecido.

Considerando a hipótese de que o POA deve agir intracelularmente, a preparação de ésteres como forma de transporte de POA pelas membranas do fungo poderia incrementar a atividade antifúngica. Assim, uma série de seis pirazinoatos (**2-7**) foram avaliados quanto à atividade antifúngica. Os pirazinoatos de etila (**3**) e de isopropila (**4**) foram os compostos que apresentaram a melhor atividade antifúngica. O composto **3** foi o mais ativo em *C. albicans*, e especialmente em *C. parapsilosis*, sendo que neste último o  $\text{IC}_{50}$  é menor que a menor concentração testada (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Já o composto **4** foi ativo em todas as espécies. Aparentemente, a esterificação do POA leva ao aumento da atividade antifúngica, como pode ser observado pelos valores de  $\text{IC}_{50}$  em escala micromolar, já que o aumento da massa molecular dos ésteres tornam os valores de concentração em gramas muito próximos. Possivelmente, a esterificação incrementa a lipofilicidade, levando ao aumento da concentração de POA intracelular.

Entretanto, este comportamento não parece linear. O composto pirazinoato de *n*-butila (**5**) é o mais lipofílico dos análogos propostos (como pode ser observado pelo logP, tabela 2), mas não demonstrou atividade antifúngica apreciável em nenhuma espécie. Por outro lado, o pirazinoato de 2-(pirazinoiloxi)etila (**7**) também não mostrou inibição relevante em nenhuma das espécies avaliadas, e é o mais hidrofílico dos compostos. Portanto, pode-se supor que a lipofilicidade não é a única característica ligada à atividade antifúngica dos compostos testados. Sugere-se então que a inserção de até três carbonos na cadeia lateral de ésteres de POA pode exercer um papel positivo no aumento da atividade antifúngica dos compostos.

Outro efeito que pode interferir na atividade antifúngica é o efeito estérico. Percebe-se que apesar do aumento da cadeia lateral dos compostos **5** e **7**, a atividade antifúngica foi

bastante reduzida. Assim, supõe-se que o aumento de volume pode exercer efeito estérico significativo, que pode diminuir a ativação dos ésteres no respectivo POA, levando à baixa atividade intracelular. Entretanto, estudos mais específicos, utilizando uma série maior de compostos é necessária para sustentar essa hipótese.

Simões e colaboradores (2009) estudaram o efeito da lipofilicidade e do volume na atividade antimicobacteriana dos ésteres de POA. Os pesquisadores sintetizaram uma pequena série de ésteres de POA de cadeias alquílicas longas (12, 14 e 16 carbonos) com o intuito de aumentar a lipofilicidade destas moléculas e assim verificar se com isso seria possível aumentar também a capacidade de penetração destes ésteres na parede celular das micobactérias. Os resultados mostraram que os ésteres apresentaram um aumento significativo na atividade antimicobacteriana se comparado com o POA e a PZA, em especial o éster com 14 carbonos, com MIC de 10-20  $\mu\text{g/mL}$ . Porém, os derivados amídicos não apresentaram atividade considerável, possivelmente por dificuldades na ativação do POA no ambiente intracelular.

Fernandes e colaboradores (2013) também verificaram que existe uma relação direta entre o aumento da cadeia lateral de ésteres de POA com o aumento da lipofilicidade e conseqüentemente o aumento da atividade antimicobacteriana. Verificaram que pirazinoato de isobutila, pirazinoato de alila, pirazinoato de 2-cloroetila e pirazinoato de *n*-propila apresentam MIC abaixo de 3,96  $\mu\text{g/mL}$ . Neste mesmo trabalho, verificou-se também que quando os ésteres são muito lipofílicos, estes têm sua atividade antimicobacteriana diminuída devido a diminuição da hidrossolubilidade, dificultando assim o processo de difusão pela parede celular da micobactéria, como pode ser verificado nos resultados de Simões e colaboradores (2009).

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os métodos utilizados para síntese de ésteres do ácido pirazinóico foram eficientes, pois os rendimentos obtidos foram bons e foi possível verificar que os produtos eram realmente os ésteres de interesse, utilizando as técnicas de RMN.

Conclui-se que os compostos pirazinoato de etila **3** e pirazinoato de isopropila **4** apresentaram as melhores atividades antifúngicas dentre os compostos avaliados neste trabalho, permitindo assim assumir que a lipofilicidade é um fator importante para a atividade antifúngica dos ésteres do POA. Entretanto, parece existir um valor ótimo de lipofilicidade que deve ainda ser determinado.

Por fim, conclui-se que os ésteres de ácido pirazinóico apresentam atividade antifúngica significativa, tornando-os assim promissores protótipos para o desenvolvimento de compostos com atividade aprimorada futuramente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, T.S.B, **Desenvolvimento de pró-fármacos do ácido pirazinóico activados por esterases de micobactérias**. Tese de Mestrado. Universidade do Porto, 2011.
- ALVARES, C.A.; SVIDZINSKI, E.I.T ; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- BARBEDO, L.S., SGARBI, D.B.G. Candidíase. **J. bras Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 22, n. 1, pp. 22-25, 2010.
- BERGOLG, A.M; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, pp. 159 -172, 2004. Disponível em <<http://www.unifal-mg.edu.br/fcf/files/Agentes%20antif%C3%BAngicos.pdf>> Acessado em 10/10/16.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 12 ed., Rio de Janeiro: Artmed, 2013.
- CARVALHO, L.I.C. **Aspergillus e Aspergilose – Desafios no combate da Doença**. Tese de Mestrado – Universidade do Fernando Pessoa. 2013. 43p. Tese de Mestrado – Universidade do Fernando Pessoa.
- CHAI, L.Y.; DENNING, D.W.; WARM, P. Candida tropicalis in human disease. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 36, n. 4, pp. 282-298, 2010.
- CHONG, R. C.; SULLIVAN, D.J . New uses of old drugs. *Nature*, vol . 448, pp. 645-46, 2007
- CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos . **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v. 41 n. 2, pp. 155-180, 2005.
- CORTES, J.A.L.; RUSSI, J. A.N. Equinocandinas. **Rev. Chil. Infectol**, v. 28, n. 6, pp. 529-536, 2011.
- CYNAMON, M.H.; GIMI, R.; GYENES, F.; SHARPE, C.A.; BERGMANN, K.E.; HAN, HJ.; GREGOR, L.B.; RAPOLU, R.; LUCIANO, G.; WELCH, J.T. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimycobacterial activity. **J. of Med. Chem.**, v. 38, pp. 3902-3907, 1995.
- CYNAMON, M.H.; KLEMENS, S.P. Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters. **J. of Med. Chem.**, v. 35, pp. 12112-1215, 1992.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 2393-2404, 2004.

- FARIA, N.C.G.; KIM, J.H.; GONÇALVES, L.A.P.; MARTINS, M.L; CHAN, K.L.; CAMPBELL, B.C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Appl. Microbiol.**, v. 52, n. 3, pp. 506-511, 2011.
- FARKAS V. Structure and biosynthesis of fungal cell walls: Methodological approaches. **Folia Microbiol.** v. 48, pp. 469-477, 2003.
- FELDSTEIN, S.; TOTRI, C. ; FRIEDLANDER, S.F. Antifungal therapy for onychomycosis in children. **Clin. Dermatol.** v. 33, n. 3. pp. 333-339.
- FERNANDES, J.P.S. Síntese e atividade antimicrobiana de ésteres do ácido pirazinóico e quinolonas. Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo. 2006. 141p. Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo.
- FERNANDES, J.P.S.; FELLI, V.M.A. Evaluation of the influence of base and alkyl bromide on synthesis of pyrazinoic acid esters through factorial design. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, pp.2464-2466, 2009.
- FERNANDES, J.P.S.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F; FELLI, V.M.A. Evaluation of a pyrazinoic acid prodrug in *Mycobacterium tuberculosis*. **Saudi Pharm. J.**, v. 22, pp.376–380, 2013.
- FERNANDES, J.P.S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A.C.G.; SOUZA, M.R.; SILVA, G.R.; CIANCIULLI, M.E.; CORRÊA, M.F.; FERRARINI, M. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: Uma aula prática. **Quim. Nova**, v. 36, n. 6, pp.890-893, 2013.
- FERREIRA, L.G.; ANDRICOPULO, A.D. Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective. **Drug Discovery Today**, v. 0, n. 00, 2016.
- FERREIRA, W.A.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes**. 2ª ED. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- FREIMOSER, F.M.; JAKOB, C.A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **App. and Environm. Microbiol.**, v. 65, n. 8 pp. 3727-3729, 1999.
- FUKUDA, E.K; VASCONCELOS, A.F.D.; MATIAS, A.C.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, M.L.C. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization . **Ciê. Agrárias**, v. 30, n. 1, pp. 117-134, 2009.

- GOLAN, D. E.; JUNIOR, A.H.T.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- HAN, H. K.; AMIDON, G. L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. **AAPS Pharm. Sci.**, v.2., p.E6, 2000.
- KAWASE, K.Y.F.; COELHO, G.L.V.; LUCHESE, R.H.L. Uso de conservadores ácido benzóico e benzoato de sódio no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja. **Rev. de Ciên. da Vida**, v. 28, n. 2, pp. 53-62, 2008.
- KIM J.H., CAMPBELL, B.C., MAHONEY, N., CHAN, K.L., MOLYNEUX R.J., and BALAJEE, A., Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. **Fungal Biol.**,v. 114, pp. 817–824, 2010.
- KIM, J.H.; MAHONEY, N.; CHAN, K.L.; MOLYNEUX, R.L.; MAY, G.S.; CAMPBELL, B.C. Chemosensitization of fungal pathogens to antimicrobial agents using benzo analogs. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 281, pp. 64–72, 2008.
- KON, A.S., Consenso em criptococose. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, v. 41, n. 5, pp. 524-544, 2008.
- KREBS, H.A., WIGGINS, D., STUBBS, M., SOLS, A., BEDOYA, F. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **Biochem. J.**, v. 214, n. 3, pp. 657–663, 1983.
- MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 10, n. 1, pp. 1-10, 2004.
- MURRAY, J.F.; SCHRAUFNAGEL, D.E.; HOPEWELL, P.C. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. **Annals of the Am. Thorac. Soc.**, vol. 12, n. 12 , pp. 1749-1759, 2015.
- NETO, M.M.; DANESI, C.C.; UNFER, D.T. Candidíase Bucal – Revisão da literatura. **Saúde**, v. 31 n. 1- – 2, pp.16-26, 2005..
- NGO, S.C.; ZIMHONY, O.; CHUNG, W.J.; SAYAHI, H.; JACOBS, W.R.; WELCH, J.T. Pyrazinamide Analogs. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 51, n. 7, pp. 2430–2435, 2007.
- NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Antifungal drugs for small and large animals. **Ciênc. Rural**, v. 32, pp. 175–184, 2002.

- NORD, National Organization for Rare Diseases <<https://rarediseases.org/rare-diseases/paracoccidioidomycosis/>> Acessado em 26/10/16.
- PICHOVÁ, I.; PAVLÍCKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJSÍ, E.; HRUSKIVÁ-HEIDINGSGELDOVÁ, O.; WEBER, J.; RUMML, T.; SOUCEK, M. Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2669-77, 2001.
- SEGRETTI, N.D.; SIMOES, C.K.; CORRÊA, M.F.; FELLI, V.M.A.; MIYATA, M; CHO, S.H.; FRANZBLAU, S.G.; FERNANDES, J.P.S. Antimycobacterial activity of pyrazinoate prodrugs in replicating and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 99, pp. 11-16, 2016.
- SIMÕES, M.F.; VALENTE, E.; GÓMEZ M.J.R.; ANES, E.; CONSTANTINO, L. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs: Stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 37, n. 3-4, pp. 257-263, 2009.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. v.1 e 2. 9 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.
- SPEIRS, R.J.; WELCH, J.T.; CYNAMON, M.H. Activity of n-propyl pyrazinoate against pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: investigations into mechanism of action of and mechanism of resistance to pyrazinamide. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 6, pp. 1269-1271, 1995.
- SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIM, T.N.; LOPES, N.D.; LIMA, M.E.F. CYP51: Uma boa idéia? **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 2, pp.539-575, 2015.
- TADANO, T.; PAIM, N.P.; HUEB, M.; FONTES, C.J.F. Entomofitose (zigomicose) causada por *Conidiobolus coronatus* em Mato Grosso (Brasil): relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 38, n. 2, p. 188-190, 2005.
- THORN RESEARCH INC. Undecylenic acid monograph. **Alternative Med. Rev.**, v. 7, n. 1, pp. 68-70, 2002. Disponível em <http://www.altmedrev.com/publications/7/1/68.pdf> Acessado em 25/10/16.
- TORTORA, G.R.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.
- TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 4, pp.606–625, 2008.

WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. **The practice of medicinal chemistry**, 3 ed., London: Academic Press, p. 697-7167, 2003.

WHEAT, L.J; AZAR, M.M.; BAHR, N.C.; SPEC, A.; RELICH, R.; HAGE, C. Histoplasmosis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 30, p.p 207–227, 2016.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, v. 7, pp. 6-21, 2003.