



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO



**instituto de**  
**ciências farmacêuticas**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

**JULIANA BARROS DE ARAÚJO LESSA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE DERIVADOS DE TIOUREIAS CONTENDO  
PIPERAZINA COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

**MACAÉ**

**2022**



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO



**instituto de**  
**ciências farmacêuticas**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

JULIANA BARROS DE ARAÚJO LESSA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE DERIVADOS DE TIOUREIAS CONTENDO  
PIPERAZINA COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Alvarez Abreu

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Gonçalves

Pupe

MACAÉ

2020

## CIP - Catalogação na Publicação

L638a Lessa, Juliana Barros de Araújo  
AVALIAÇÃO IN VITRO E IN SILICO DE DERIVADOS DE  
TIOUREIAS CONTENDO PIPERAZINA COM POTENCIAL  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA / Juliana Barros de Araújo  
Lessa. -- Rio de Janeiro, 2022.  
58 f.

Orientadora: Paula Alvarez Abreu.  
Coorientadora: Carolina Gonçalves Pupe.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia,  
2022.

1. Microbiologia. 2. Química Medicinal. I. Abreu,  
Paula Alvarez, orient. II. Pupe, Carolina Gonçalves,  
coorient. III. Título.

JULIANA BARROS DE ARAÚJO LESSA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE DERIVADOS DE TIOUREIAS CONTENDO  
PIPERAZINA COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para  
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 21 de dezembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Alvarez Abreu  
<http://lattes.cnpq.br/1275935652105959>  
Orientador e Presidente da Banca  
Instituto de Ciências farmacêuticas UFRJ

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Oliveira Guimarães  
<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>  
Instituto de Ciências farmacêuticas UFRJ  
1<sup>o</sup> Examinador

Pós-Dr. Vitor Won-Held Rabelo  
<http://lattes.cnpq.br/6665791178152426>  
Instituto de Biologia UFF  
2<sup>o</sup> Examinador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado forças e me direcionado a uma nova rota que me permitiu amadurecer nesse período de graduação, pela oportunidade de concluir este trabalho e o curso de graduação em Farmácia.

Em segundo lugar, minha eterna gratidão aos meus pais Adriana e Max e meu irmão Pedro, que sempre apoiaram e apoiam meus sonhos e conquistas, por nunca terem medido esforços para me proporcionar um ensino de qualidade, sem eles esta não seria possível.

Minha gratidão ao meus avós, Lezy, Ezequias e Zenaide, por serem exemplo de resiliência, nos momentos difíceis longe da família compreenderam minha ausência e reforçaram a importância da universidade no meu futuro.

Ao meu namorado Alex, pelo companheirismo, me apoiando e sonhando junto comigo nessa caminhada durante a graduação, que me fez acreditar que seria possível em meio aos desafios, que se desdobrou em esforços para estar presente.

A minha tia Simone, que sempre me incentivou a estudar e valorizar a busca pelo conhecimento.

As minhas irmãs de coração Maria Gabriela e Yve, por todo incentivo, conselhos e por vibrarem comigo em cada conquista.

A minha família macaense, Nathalia, Joyce, Gabriela e Millena, que tornaram esse período mais leve, com risadas, conselhos, amizade durante esses cinco anos.

As minhas orientadoras Paula Alvarez Abreu e Carolina Gonçalves Pupe por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e por acreditarem em mim no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores Lucio e Gil por ter concedido as substâncias utilizadas, a Fundação Oswaldo Cruz pela viabilização das cepas de fungos, a Daiane de Jesus Viegas e Paula Veronesi por me auxiliarem no laboratório e explicarem como realizar os ensaios, e a FAPERJ pelo financiamento da pesquisa.

Aos meus amigos de graduação que compartilharam dessa caminhada comigo, e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As infecções fúngicas afetam em torno de 1,7 bilhões de pessoas no mundo, ocasionando em sua maioria formas cutâneo-mucosas brandas. Entretanto, podem ocorrer formas severas acometendo a corrente sanguínea e diversos órgãos, e que representam uma ameaça a saúde em todo o mundo. *Candida spp* é um fungo presente na microbiota humana. As espécies de leveduras de maior importância clínica são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. *Candida* sp é um importante patógeno envolvido em infecções relacionadas a assistência em saúde principalmente infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, contudo o arsenal de medicamentos para o tratamento destas infecções é limitado e se agrava com o aumento da resistência aos já existentes. Assim se faz necessária a busca por novos candidatos a fármacos de diferentes classes para atuar em novos alvos terapêuticos. Derivados de tioureia já foram descritos na literatura com atividades antifúngicas, antibacterianas, antitumoral e antiviral, sendo uma classe com potencial para desenvolvimento de novos medicamentos. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial antifúngico de derivados de tioureia contendo o núcleo piperazina contra espécies de *Candida* e avaliar o seu perfil farmacocinético e toxicológico. Foi realizado o teste de disco difusão em triplicata, as cepas foram repicadas e incubadas em ágar Mueller-Hinton por 24 horas a 35 °C, após isso as substâncias testadas foram diluídas em DMSO em 5 mg/mL e colocados 5 µL em discos estéreis acomodados nas placas inoculadas, e colocado na estufa por 48 horas a 35°C, a fim de analisar qualitativamente se as substâncias têm potencial atividade nas cepas ATCC de *C. krusei*, *C. glabratae* *C. albicans*. O perfil farmacocinético e toxicológico de 14 derivados de tioureias foi testado *in silico* utilizando os programas Molinspiration, Osiris Property Explorer, PKCSM, SwissADME e FAF-Drugs4 de modo a avaliar o potencial destas substâncias. Propriedades físico-químicas, mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritantes e reprodutivos, hepatotoxicidade, potencial como inibidores covalentes, PAINS, regras da indústria farmacêutica como Lipinski, Veber, Lilly, GSK dentre outras. Posteriormente nos resultados *in silico*, as 14 substâncias apresentaram baixo risco para efeitos irritantes e reprodutivos, assim como para tumorigenicidade e mutagenicidade, 11 entre as 14 estruturas apresentaram valores de drug-score maiores ou iguais a 0,8. Dentre elas, nenhuma apresentou inibição ao gene hERG1, apesar de 50% das estruturas demonstrarem inibição a hERG2 e eles não foram preditos como PAINS. Os resultados de disco difusão em ágar não apresentaram atividade em *C. krusei* e em *C. glabrata*, porém duas substâncias apresentaram qualitativamente atividade em *C. albicans* mostrando-se promissoras para atividade antifúngica. Com isso, os derivados de tioureias em estudo apresentaram resultados promissores *in silico* em relação às propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, e nos estudos *in vitro* 2 estruturas se mostraram promissoras em atividade antifúngica. Dessa forma, como perspectivas do estudo, tem-se a veiculação destas substâncias que apresentarem atividade em formulações transdérmicas.

**Palavras-chave:** tioureias, *in silico*, *Candida spp*, antifúngico

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem esquemática e de microscopia eletrônica de varredura da <i>Candida</i> spp. Imagem adaptada Wightman et al. 2004.....	13
Figura 2. Linha temporal de antifúngicos sistêmicos liberados no mercado. Figura adaptada de Lewis, 2011. ....	15
Figura 3. (a) estrutura química da anfotericina b e (b) nistatina .....	16
Figura 4. Mecanismos de ação dos fármacos antifúngicos. Figura adaptada de Katzung, et al. 2014. ....	17
Figura 5. Estruturas químicas dos fármacos azóis comerciais.....	19
Figura 6. Mecanismos de resistência da <i>Candida</i> spp frente aos antifúngicos comerciais. ....	20
Figura 7. Estruturas químicas da tioureia (a) e do núcleo piperazina (b). ....	22
Figura 8. Fluxograma referente à metodologia.....	30
Figura 9. Estruturas de derivados de tioureias com núcleo piperazina. ....	31
Figura 10. Representação esquemática do ensaio de disco difusão em ágar. ....	34
Figura 11. <i>Druglikeness</i> e <i>drug score</i> dos derivados de tioureias. ....	37
Figura 12. Imagem dos ensaios de disco difusão em ágar com presença de halo de inibição em <i>C. albicans</i> em labTIF146 (a) e labTIF164 (b).....	42

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos de derivados de tioureias com núcleo piperazina: massa molar (MM), coeficiente de partição octanol-água (cLogP), número de receptores de ligação de hidrogênio (nON), número de doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH), solubilidade em água (LogS), área de superfície polar (TPSA), número de ligações rotacionáveis (nRotb).....	36
Tabela 2. Classificação da toxicidade de derivados de tioureias contendo o anel piperazina: Mutagenicidade (Mutag.), Tumorigenicidade (Tumorig.), Efeitos irritantes (ef. Irritantes), efeitos reprodutivos (ef. Reprod.), Hepatotoxicidade (hepatotox.), inibidor hERGI (inib. hERGI), inibidor hERGII (inib. hERGII), toxicidade de AMES (Tox de AMES).....	39
Tabela 3. Classificação de derivados de tioureias de acordo com as regras da indústria farmacêutica pelo <i>software</i> FAFDrugs4 para segurança do fármaco (GSK4 / 400, Pfizer 3/75, Lilly e regra dos 5 de Lipinski) .....	41
Tabela 4. Atividade antifúngica de derivados de tioureias com núcleo piperazina nos testes de disco difusão com medida dos halos de inibição. ....	43
Quadro 1. Resultados obtidos para estruturas derivadas de tioureias com atividade antifúngica descrita na literatura.....	44



## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALH	Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
cLogP	Coeficiente de partição n-octanol/água calculado
DLH	Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMPG	Diesteroilfosfatidilglicerol
DMPC	Diesteroilfosfatidilcolina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
LogS	Solubilidade em água estimada
nRot	Número de ligações rotacionáveis
PAINs	<i>Pan Assay Interference Compounds</i>
MM	Massa molecular
IRAS	Infecção relacionada a assistência à saúde
UTI	Unidade de terapia intensiva
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus de imunodeficiência humana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ADMETox	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
hERG	Human Ether-a-go-go-Related Gene
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
µL	Microlitro
EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i> - Agência de Proteção Ambiental
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i> - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
MFC	Concentração mínima fungicida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 Epidemiologia de infecções fúngicas no Brasil e no mundo.....	11
1.2 Espécies de <i>Candida</i> e importância clínica.....	12
1.3 Fármacos antifúngicos.....	14
1.4 Mecanismos de resistência da <i>Candida</i> spp.....	19
1.5 Busca por novos fármacos.....	21
1.6 Derivados de Tioureias.....	21
1.7 Estudos <i>in silico</i> de propriedades ADMETox.....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
4.1 Obtenção dos derivados de tioureia contendo piperazina.....	30
4.2 Análise <i>in silico</i> dos derivados de tioureias contendo piperazina.....	31
4.2.1 Análise das propriedades físico-químicas.....	32
4.2.2 Análise das propriedades farmacocinéticas.....	32
4.2.3 Avaliação da toxicidade <i>in silico</i> .....	33
4.2.4 Análise das regras da indústria farmacêutica.....	33
4.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	33
4.3.1 Teste de disco difusão em ágar .....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
5.1. Análise <i>in silico</i> dos derivados de tioureias contendo piperazina.....	35
5.1.1 Análise das propriedades farmacocinéticas.....	35
5.2.2 Avaliação da toxicidade <i>in silico</i> .....	38
5.2.3 Análise das regras da indústria farmacêutica.....	39
5.2. Análise da atividade antifúngica.....	41
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epidemiologia de infecções fúngicas

As infecções fúngicas apresentam um grande impacto na saúde humana, vide que a forma cutânea está contida entre as doenças mais comuns no mundo, apenas atrás de dor de cabeça e cáries, afetando em torno de 1,7 bilhão de pessoas. A incidência de cada infecção varia e está relacionada com regiões geográficas, condições socioeconômicas e hábitos culturais. Em maioria, estas infecções são superficiais presentes na pele, em mucosas, cabelos e unhas, de fácil tratamento, porém milhões de pessoas no mundo são afetadas pelas infecções classificadas como invasivas que podem acometer tecidos, órgãos e a corrente sanguínea, e são difíceis de diagnosticar e tratar, com alta taxa de morbidade e mortalidade (BONGOMIN et al., 2017; BROWN et al., 2012; LIFE, 2017).

Segundo dados apresentados em 2020 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), doenças fúngicas consistem em uma ameaça a saúde pública mundial, principalmente as infecções oportunistas que acometem pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes com câncer, AIDS, tuberculose, transplantados ou fazendo uso de medicamentos imunossupressores, infecções nosocomiais. Corroborando com isso há o surgimento de cepas resistentes e infecções adquiridas em áreas geográficas específicas (CDC, 2020; GAFFI, 2016; KULLBERG; ARENDRUP, 2015; RODRIGUES, 2019). Em 2007, Vincent e colaboradores realizaram um estudo englobando 1265 unidades de tratamento intensivo (UTIs) em 75 países que constatou que 19% das infecções presentes eram causadas por fungos (VINCENT et al, 2009). Estima-se que os custos relacionados a doenças fúngicas invasivas em 2019 nos EUA em ambientes hospitalares foi cerca de 3,6 bilhões de dólares (BENEDICT et al. 2019).

Nas últimas décadas, a quantidade de pacientes imunocomprometidos tem aumentado corroborando com o aumento de infecções fúngicas oportunistas (ASCIOGLU et al., 2002). Neste panorama, com os altos números de casos de óbitos desta forma invasiva, não há um devido reconhecimento de seu impacto, nem programas de monitoramento e acompanhamento de infecções fúngicas de agências de saúde ao redor do mundo, exceto o CDC, isso pode estar relacionado

com o baixo investimento na área de micologia em comparação as outras infecções (CDC, 2019; GAFFI, 2016; RODRIGUES, 2019).

Na América latina, tem-se prevalência de algumas infecções fúngicas invasivas endêmicas. Dentre elas há paracoccidioidomicose, micetoma, esporotricose, cromoblastomicoses, entre outras, que há disseminação pelo contato com solo contaminado. Estas são infecções consideradas negligenciadas, prevalentes em áreas rurais, com assistência à saúde inadequado e geralmente associadas populações marginalizadas, que há tratamentos eficazes, porém devido a diagnósticos tardios, podem impactar a qualidade de vida destas populações (GAFFI, 2018).

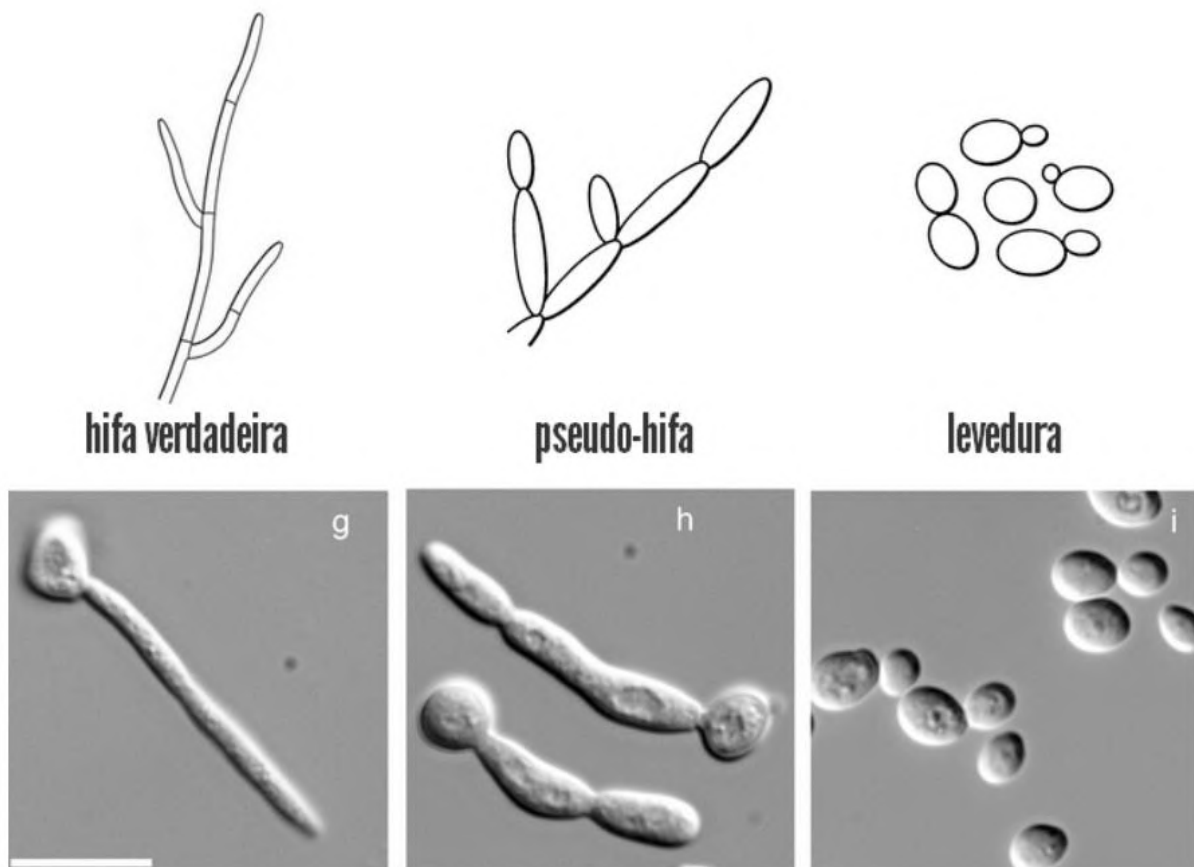
No Brasil, estima-se que 3,8 milhões de pessoas são acometidas por infecções fúngicas invasivas. Esses dados são estimados a partir de estudos publicados, vide que as infecções fúngicas não estão presentes na Lista Nacional de Doenças e Agravos de Notificação Compulsória exposta na Portaria GM/MS nº 420 de 2 de março de 2022, assim dificultando a aquisição de dados epidemiológicos precisos na incidência destas infecções no país. Essa subnotificação corrobora para a limitação em recursos para diagnóstico e tratamento devido ao seu alto custo para tal assistência (GIACOMAZZI et al., 2016; RODRIGUES, 2019; BRASIL, 2022).

De acordo com Borba e colaboradores (2018), o custo de tratamento de infecções invasivas por fungos pode ser superior a 400 mil reais por paciente, torna-se clara a necessidade de ações que buscam controlar e identificar de forma mais rápida para que o tratamento seja feito de forma efetiva em um estágio mais cedo da infecção. Dentre os gêneros causadores de infecções invasivas, destacam-se o *Aspergillus* sp., *Cryptococcus* sp. e a *Candida* sp. (BORBA et al., 2018; GIACOMAZZI et al., 2016; RODRIGUES, 2019).

## **1.2. Espécies de *Candida* de importância clínica**

*Candida* sp. consiste em um gênero de fungo leveduriforme que faz parte da microbiota do organismo humano, porém quando há um desequilíbrio no sistema imunológico ela pode causar infecções. Este gênero é caracterizado por ser um blastoconídeo medindo cerca de 3 a 5 µm, de forma ovoide, que está susceptível a crescimento em temperaturas entre 20 e 38°C, em uma faixa de pH de 2,5 a 7,5. Estas apresentam um polimorfismo que as permite converter a sua reprodução

leveduriforme em micélio, assim podendo ter hifas e pseudohifas (Figura 1), esta característica encontra-se associada ao aumento de virulência por este gênero fúngico (SANTANA, et al 2013). Dentre as espécies de maior importância clínica são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Estas infecções podem ser superficiais, que consistem nas manifestações na pele ou em mucosas, chamadas de candidíase cutaneomucosa, ou invasivas sistêmicas, que podem acometer órgãos e tecidos. Ao disseminar pela corrente sanguínea, a infecção é chamada de candidemia (BHATTACHARYA et al. 2020; CDC, 2019; VIEIRA; DO NASCIMENTO, 2017).



**Figura 1.** Imagem esquemática e de microscopia eletrônica de varredura da *candida* spp. Figura adaptada Wightman et al. 2004

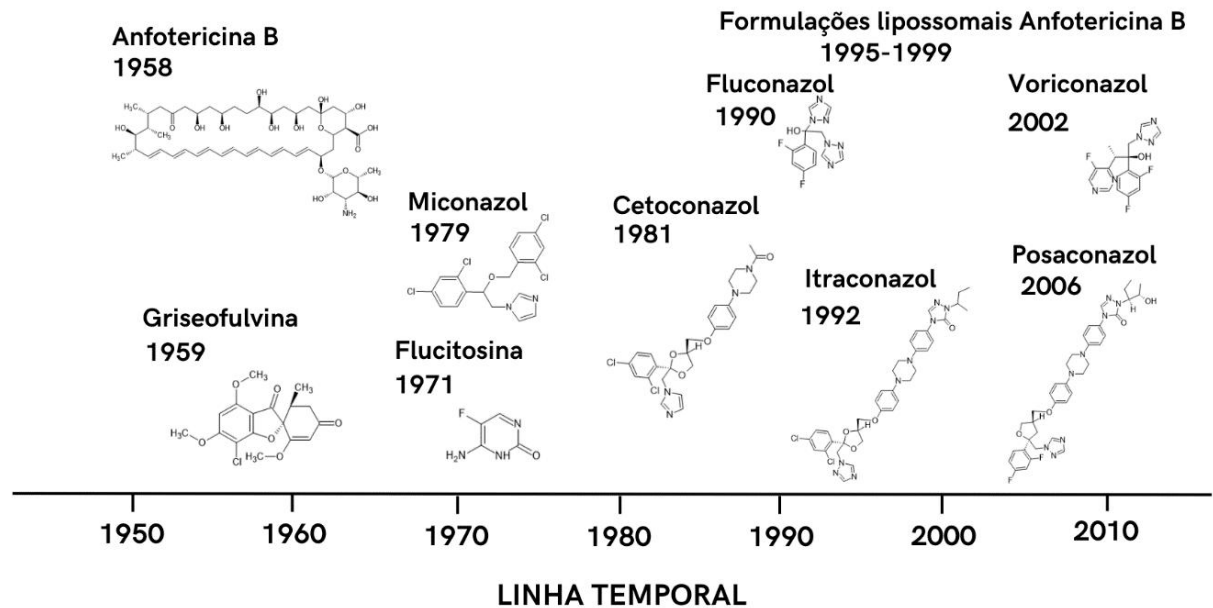
A fim de promover um tratamento eficaz, é preciso de um diagnóstico direcionado para candidíase invasiva: as formas direta e indireta. Segundo Kullberg e Arendrup (2015), a detecção direta consiste em retirar uma amostra de sangue ou tecido infectado e colocar em cultura em locais estéreis, e a detecção indireta que é utilizado o teste de PCR com marcadores, sendo o primeiro com uma sensibilidade entre 21 e 71% e o segundo de 89%.

Ao longo dos anos, observou-se que as infecções fúngicas sistêmicas têm crescido significativamente, principalmente as oportunistas causadas por *Candida* spp. em pacientes com imunidade comprometida em UTIs, em que a sepse é a principal causa de morte. A infecção invasiva causada por *Candida* spp, está ranqueada entre as 4 infecções mais comuns presentes em ambientes hospitalares nos Estados Unidos. Este fato está intrinsecamente relacionado aos riscos presentes na estadia prolongada em UTIs, pelo uso de cateteres venosos, cirurgias abdominais recentes, medicamentos imunossupressores, antibióticos de amplo-espectro, essa infecção pode ser ocasionada por instrumentos contaminados e mãos não higienizadas corretamente (NICHELLE et al. 2019; RICOTTA et al., 2021; VARANO et al., 2019)

Nesse contexto, desde 2009 uma nova espécie, *Candida auris*, que é conhecida principalmente por ser multirresistente a várias classes de antifúngicos, vem crescendo e se disseminando em pacientes debilitados no ambiente nosocomial. Em 2019, foi reportado pelo CDC que os casos desta espécie cresceram em torno de 318% quando comparados com a quantidade média de casos reportados entre 2015 e 2017 (CDC, 2019; GURGUÍ; CUENCA-ESTRELLA, 2008; MCCARTHY; WALSH, 2017). Essas infecções levam a longas estadias e alta taxa de mortalidade, isto pode estar associado com a capacidade do fungo de formar biofilmes em cateteres e superfície de equipamentos, assim sendo mais difícil a efetividade dos medicamentos (BAPTISTA et al., 2020; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; BHATTACHARYA et al. 2020; FOTHERGILL et al., 2014).

### **1.3. Fármacos antifúngicos usados em candidíases**

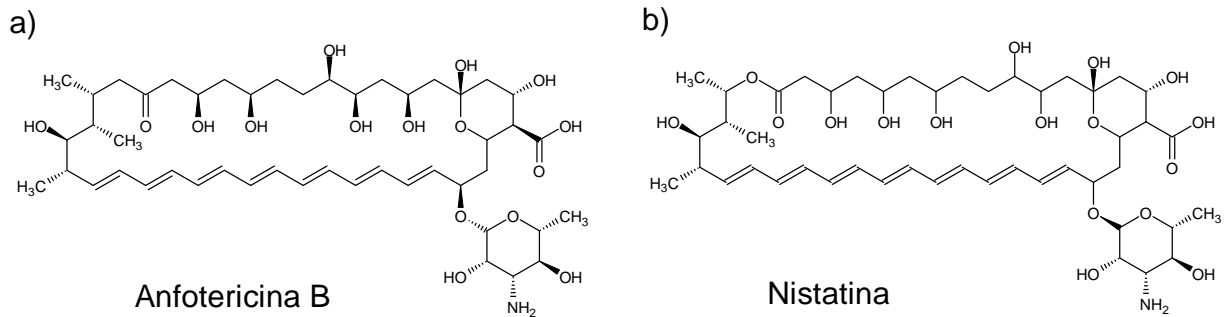
Em 1958, a anfotericina B, o primeiro fármaco com um ótimo potencial antifúngico foi desenvolvido pelo laboratório Squibb, e tornou-se o tratamento padrão para infecções fúngicas severas (Figura 2). Apesar disso, ele apresentava inúmeras reações adversas e alta toxicidade, e assim continuaram as pesquisas por outros potenciais fármacos que fossem tão eficientes quanto, porém menos tóxico e que pudesse ser administrado oralmente e de forma intravenosa, ainda assim se mantém como fármaco de escolha no tratamento de micoses sistêmicas (DUTCHER, 1968; HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020; LEWIS, 2011; FILIPPIN e SOUZA, 2006).



**Figura 2.** Linha temporal de antifúngicos sistêmicos liberados no mercado. Figura adaptada de Lewis, 2011.

Os polienos foram a primeira classe de medicamentos antifúngicos descoberta para uso em infecções sistêmicas (Figura 3). Estes fármacos possuem efeito fungicida e de amplo espectro, os fármacos principais desta classe consistem na nistatina que é utilizada para uso tópico, e a anfotericina B para o tratamento de infecções sistêmicas (FILIPPIN e SOUZA, 2006; KATZUNG, 2014; LEWIS, 2011).

A anfotericina B é sintetizada pela bactéria gram-positiva *Streptomyces nodosus* e pertence à classe dos polienos, ela consiste em um polieno macrolídeo anfótero. Esta atua de forma seletiva, pois seu alvo de ação é o ergosterol, esterol presente em membranas celulares fúngicas, enquanto nos humanos encontra-se o colesterol, assim agindo seletivamente nos fungos. Tal mecanismo de ação resume-se a ligação da anfotericina B ao ergosterol, promovendo a alteração da permeabilidade celular, assim formando poros e conseqüentemente levando a morte celular. Este fármaco possui uma gama de reações adversas associadas ao seu uso como febre, náuseas, dores de cabeça, vômitos, tremores, além de alterações cardiovasculares, disfunção renal, efeitos tóxicos sobre a medula óssea, dentre outros relacionados a administração. Foi observado que o tratamento com anfotericina B convencional é sucedido por disfunção renal que varia de grau de acordo com a dose administrada e de paciente para paciente (FILIPPIN e SOUZA, 2006; KATZUNG, 2014; LEWIS, 2011).



**Figura 3. (a)** Estrutura química da Anfotericina B e **(b)** da Nistatina.

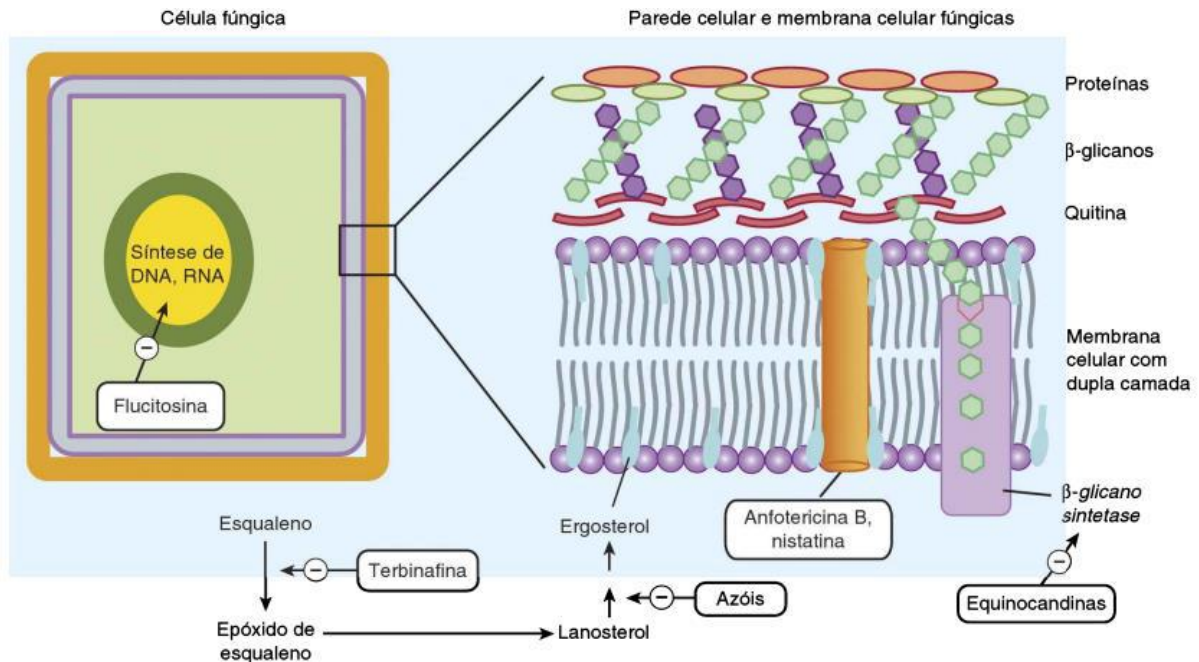
Mesmo com a alta toxicidade, a anfotericina B convencional ainda é o antifúngico de maior espectro de ação. Porém, há as formulações lipossomais que reduzem a toxicidade sem comprometer a eficácia do medicamento, estas se apresentam de três formas: uma preparação lipossomal de vesículas pequenas preparadas a partir de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e anfotericina B (razão 2:1:0,8:0,4), a segunda consiste em uma dispersão coloidal de anfotericina B em sulfato de colestirila sódica (1:1) em partículas em forma de disco e por fim o complexo lipídico com a anfotericina B multilamelar composto por diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e DMPG (razão 7:3 com 36% mol de anfotericina B) (KATZUNG et al 2014; FILIPPIN e SOUZA, 2006).

Essas formulações possibilitam o uso de concentrações mais elevadas de forma que apresentem menor toxicidade, permitindo que pacientes não responsivos ao tratamento convencional e com insuficiência renal possam fazer uso, ainda que possua efeitos indesejáveis. Apesar de estar menos associada a nefrotoxicidade, o uso das formulações possui um custo elevado e está relacionado com o aumento da incidência de hepatotoxicidade, vide que há um acúmulo das formulações lipossomais no fígado e nos pulmões pela captação deles pelo sistema retículo endotelial (KATZUNG et al 2014; FILIPPIN e SOUZA, 2006).

O arsenal de fármacos utilizados na atualidade para o tratamento antifúngico no geral consiste em diferentes classes: os azóis, polienos, equinocandinas, alilaminas, griseofulvina e flucitosina, agindo em diferentes alvos na célula fúngica. Os principais alvos dos fármacos antifúngicos consistem no DNA, na tubulina, proteína responsável pela formação de microtúbulos na divisão celular, parede celular do fungo e no ergosterol presente na membrana plasmática, seja na síntese



ou causando o rompimento desta membrana (ASHLEY et al., 2006; KATZUNG, 2014; LEWIS, 2011).



**Figura 4.** Mecanismos de ação dos fármacos antifúngicos. Figura adaptada Katzung, et al. 2014.

As equinocandinas têm em sua estrutura peptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo de cadeia longa e são antifúngicos de amplo espectro. Esta classe possui como mecanismo de ação inibir não-competitivamente a 1,3-β-D-glicano sintetase presente na parede celular fúngica. Dentre os fármacos dessa classe há a micafungina, anidulafungina e caspofungina. Esta classe assim como a anfotericina B são administrados de forma intravenosa, vide que possuem baixa absorção pelo trato gastrointestinal (C-A CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011; KATZUNG, 2014).

A flucitosina consiste em um análogo a pirimidina que age inibindo uma enzima responsável pela codificação do RNA e do DNA, este medicamento ainda é comercializado na América do Norte, entretanto no Brasil foi retirada da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) uma vez que a monoterapia apresentava resistência secundária em até 30% dos pacientes, diversas reações adversas como náuseas, vômitos, diarreia, sonolência, depressão medular, que acarreta a anemias e outras alterações sanguíneas, altas concentrações do fármaco inalterado na urina e hepatotoxicidade. Este medicamento possui uso restrito a terapia combinada com itraconazol no tratamento de cromoblastomicose ou

combinada com anfotericina B no tratamento de meningite criptocócica (BRAZIL, 2007; KATZUNG, 2014; LEWIS, 2011; WALL; LOPEZ-RIBOT, 2020).

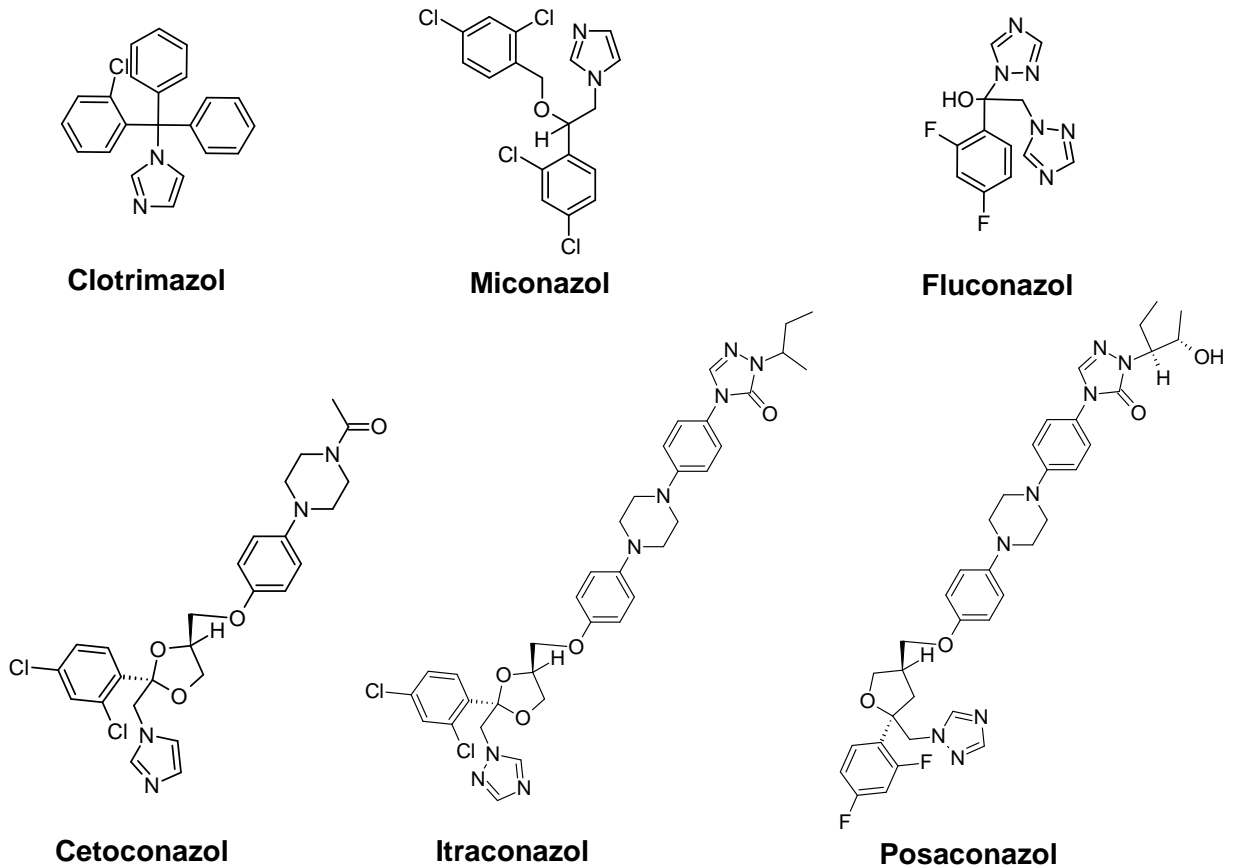
O avanço da terapia antifúngica se deu com o desenvolvimento dos azóis, que são divididos em gerações por similaridade físico-química e indicações de tratamento. A primeira geração desses fármacos foi introduzida no mercado em 1958 com o clomidazol, seguido do miconazol em 1969 e ceconazol em 1974, todos eram utilizados como agentes tópicos. A segunda geração de azóis foi apresentada com a introdução do cetoconazol no mercado em 1981, esta geração abrangia as características esperadas em relação ao espectro de ação mais amplo, mais seguro, apresentava mais um grupo funcional heterocíclico, foi o primeiro azol com biodisponibilidade oral e indicado para tratamento de infecções fúngicas invasivas, entretanto possuía alta hepatotoxicidade (SHAFIEI et al, 2020; LEWIS, 2011; BHATTACHARYA et al 2020).

Posterior a isto foi criada a terceira geração dos azóis, nesta geração houve uma alteração no núcleo imidazol para o triazol. Isto levou a vantagens relacionadas com o fluconazol, o fármaco pioneiro desta geração que possui uma boa biodisponibilidade oral, ação sistêmica, melhor solubilidade, menor risco de interação medicamentosa e toxicidade, pode ser utilizado de forma intravenosa em bolus e por administração oral (SHAFIEI et al, 2020; LEWIS, 2011; BHATTACHARYA et al 2020).

A classe dos azóis desde a segunda geração, tornou-se uma promissora alternativa a terapia de infecções sistêmicas com anfotericina B devido a toxicidade relacionada a ela. O fluconazol tornou-se o medicamento antifúngico mais prescrito em tratamentos intensivos após pouco tempo de lançado (NEGRI et al., 2014). Esta classe possui um amplo espectro de ação e compõe-se dos imidazóis, como cetoconazol, miconazol e clotrimazol, e dos triazóis, como itraconazol, fluconazol, posaconazol e voriconazol, sendo apenas o segundo utilizado no tratamento de infecção sistêmica (Figura 5).

No geral, estes fármacos atuam na inibição da enzima do citocromo P450 dos fungos, a lanosterol 14 $\alpha$  desmetilase ou CYP51, que participa de uma das etapas da síntese do ergosterol. Por esta classe de antifúngicos ser mais difundida e de fácil acesso, muitos pacientes fazem uso profilático e excessivo, além do uso de tal na agricultura, culminou para o aumento de cepas resistentes a estes medicamentos,

tornando as opções escassas de tratamento ainda mais reduzidas (LEWIS, 2011; REVIE et al., 2018; WALL; LOPEZ-RIBOT, 2020).



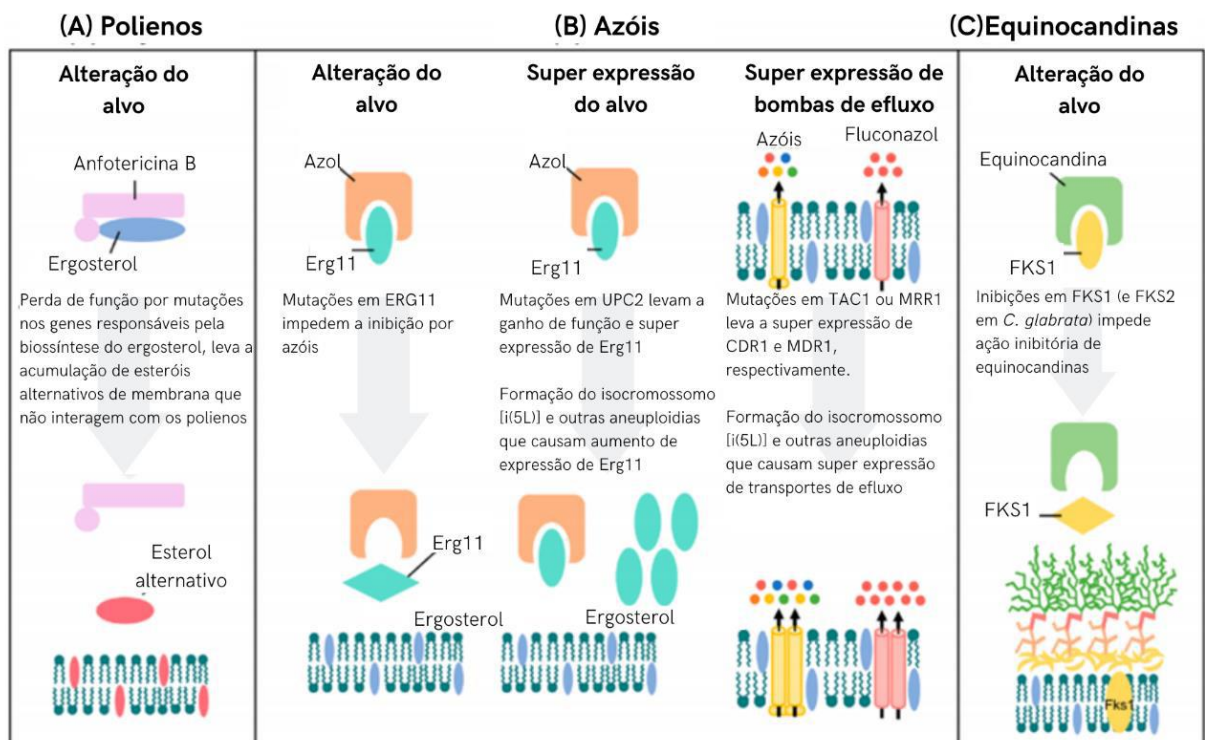
**Figura 5.** Estruturas químicas dos fármacos azóis comerciais

#### 1.4. Mecanismos de resistência da *Candida* spp

Devido ao aumento das infecções fúngicas ao longo das últimas décadas, pode-se observar a crescente resistência dos microrganismos aos fármacos utilizados para os tratamentos, principalmente de infecções invasivas. O fungo *Candida* com o passar dos anos desenvolveu mecanismos que possibilitam evadir a ação dos medicamentos utilizados. Para os azóis há alguns mecanismos como: a indução de bombas de efluxo acarretando a redução da concentração de fármaco dentro da célula, mutações pontuais no gene ERG11, codificador da enzima onde o medicamento se liga, alterando a afinidade entre o sítio e o ligante, superexpressão do alvo e a capacidade da *Candida* produzir vias alternativas compensatórias da perda do ergosterol (Figura 6) (LEE et al., 2021; MAUBON et al., 2014; PFALLER, 2012; VIEIRA; DO NASCIMENTO, 2017). Galocha e colaboradores (2022)

observaram que o transportador de hexose também é responsável por transportar derivados azólicos como o fluconazol e o posaconazol para o interior da célula da *C. glabrata*.

A resistência relacionada aos polienos é incomum, entretanto quando ocorre o mecanismo consiste nas alterações nos genes que codificam as enzimas presentes na síntese do ergosterol, promovendo uma diminuição da síntese de esteróis ou alterando-o, assim reduz a afinidade do medicamento com o sítio de ação, mesmo que raro já houve relatos em *C. auris* e *C. glabrata*. Já para as equinocandinas o mecanismo de evasão consiste em mutações específicas em genes FKS responsáveis pela codificação da enzima  $\beta$ -1,3 D-glucano sintase, reduzindo a sensibilidade ao fármaco e ineficácia da terapia (COWEN et al., 2015; LEE et al., 2021; MAUBON et al., 2014; VIEIRA; DO NASCIMENTO, 2017). Para além dos mecanismos de evasão há grande importância na resistência fúngica com a formação de biofilme pelos microrganismos, levando a baixa absorção do fármaco, seria interessante, e há estudos em desenvolvimento, de novos compostos antifúngicos a ação em biofilmes fúngicos para tratamento de infecções (SENEVIRATNE; ROSA, 2016).



**Figura 6.** Mecanismos de resistência da *Candida* spp frente aos antifúngicos comerciais.

### 1.5. Busca por novos fármacos

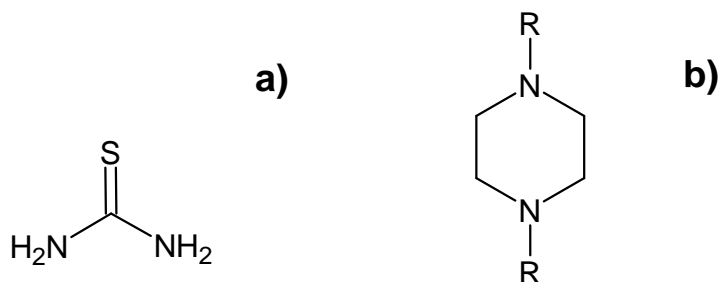
O desenvolvimento de novos potenciais fármacos antifúngicos apresenta inúmeras barreiras, vide que os fungos são seres eucarióticos, assim como humanos. Essa característica limita os possíveis alvos que os fármacos poderiam atuar, causando danos somente as células fúngicas (NICOLA et al., 2019; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016; SENEVIRATNE; ROSA, 2016). Segundo Van Daele et al. (2019), se faz necessário novos antifúngicos com modos de ação diferentes, vide que foi evidenciado que espécies de *Candida* apresentam resistência a mais de uma classe de medicamentos, como por exemplo em 2012, Pfaller et al. descobriram que 11% das candidemias ocasionadas por *C. glabrata* também eram resistentes às equinocandinas. Além da *C. auris*, que é conhecida por ser multiresistente a diversos medicamentos como o fluconazol, anfotericina B e equinocandinas (PFALLER, 2012; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016; VAN DAELE et al., 2019).

O arsenal disponível para o uso no tratamento de infecções fúngicas severa são escassos e com o aumento das cepas resistentes, bem como a toxicidade relacionada a eles dificulta na escolha do tratamento mais eficaz para o caso (LEE e LEE, 2018). Com isso, novos alvos e novas classes estão sendo estudados, além de fármacos já existentes para outros fins sendo testados para atividade antifúngica, para que atuem em sinergia com outros fármacos ou de forma isolada (BUTTS; KRYSAN, 2012). Em vista disso, faz-se necessária a busca por novos fármacos que proporcione uma terapia eficaz e segura, com menor toxicidade (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004)

### 1.6. Derivados de tioureias

As tioureias ou tiocarbamidas são uma classe de substâncias com potencial antifúngico, cujos estudos de diferentes aplicações vem crescendo significativamente, dentre elas as atividades antitumoral (GHORAB et al., 2017), antiviral (KATLA et al., 2014), antibacteriana (BIELENICA et al., 2015), etc. Essas estruturas podem ser caracterizadas pelo grupamento ureia que possui o oxigênio substituído por um enxofre (Figura 7) (ARANTES, 2009), que é responsável por uma variedade de possibilidades de interação (MANSUROĞLU et al., 2009). Estas

estruturas possuem uma boa capacidade de complexação com metais de transição, vide que a presença do grupamento tiocarbonila aumenta a habilidade de coordenação do composto. A presença de átomos doadores de hidrogênio na estrutura como oxigênio, nitrogênio, enxofre permitem uma série de reações (MANSUROĞLU et al., 2009; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ et al. 2005).



**Figura 7.** Estruturas químicas da tioureia (a) e do núcleo piperazina (b).

O grupo funcional tioureia se encontra presente em fármacos comerciais como metimazol, medicamento utilizado na terapia de hipertireoidismo (ZAMBRANA et al., 2015). Nas últimas décadas, houve um crescimento de sínteses e aplicações de tioureias dissubstituídas em ampla escala, isto se mostra pela versatilidade de ligações promovidas por ela (SAEED et al 2013). Abbas e colaboradores (2013) em um estudo a partir da incorporação de ácido hipúrico em derivados de tioureias avaliaram a atividade antifúngica e antibacteriana destes compostos. Nesta pesquisa foram descritos que derivados de tioureias substituídos com anéis aromáticos e heterociclos demonstraram atividade 2 vezes maior que o cetoconazol quando avaliada a concentração mínima inibitória em *C. albicans*.

Supuran e colaboradores (1998) em sua pesquisa, demonstra atividade antifúngica frente a *A. niger*, *A. flavus* e *C. albicans* de derivados tioureído-substituídos de 2-aminofenoxantina, em contrapartida ao seu precursor 2-aminofenoxantina que não demonstrou atividade. Da mesma forma que no trabalho realizado por Keche e Kamble (2014), é destacada a atividade antifúngica de derivados de 2-metilquinazoli-4(3H)-nona contendo ureias e tioureias, que apresentaram atividades moderadas a forte em *Candida albicans*, *Aspergillus Flavus*, *Fusarium solani*, enquanto a 2-metilquinazoli-4(3H)-nona sem estes grupos funcionais não apresentou atividade frente aos fungos.

Em 2010, Saeed e colaboradores avaliaram atividade de derivados sintéticos de pirimidinas-tioureas e de pirimidinas-tioureas fundidos a heterociclos frente a 3 espécies de *Candida spp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Neste estudo

obtiveram como resultado da MIC  $\leq$  200  $\mu\text{g/mL}$  para as 3 espécies, sendo as concentrações mínimas inibitórias referentes aos derivados sintéticos de pirimidinas-tioureas mais promissoras que aos fundidos a heterociclos.

A pesquisa de Rodríguez-Fernandez (2005) traz a atividade antifúngica de tioureas substituídas, piridil-tiourea, fenil-tiourea e tricloroetil-tiourea perante a *Pyricularia oryzae* e *Drechslera oryzae*, patógenos de plantas. Ele demonstrou que as fenil-tioureas apresentaram melhor atividade, destacando-se os derivados *p*-cloro e *p*-nitro. Além de trazer um perfil comparativo de atividade antifúngica destes compostos com seus complexos metálicos, demonstrando que a atividade dos derivados é mais favorável que os complexos.

Substâncias contendo heterociclos apresentam uma grande importância farmacêutica, visto que possuem uma participação imprescindível no metabolismo, podendo atuar como biomiméticos e farmacóforos ativos no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (MANNAM et al., 2019). Diversos fármacos presentes na clínica em terapia antifúngica e antibacteriana possuem núcleos heterocíclicos, como imidazóis, quinazolinas, triazóis, benzazóis, quinolonas, entre outros. Embora estas sozinhas não apresentem uma ação no espectro ideal desejado, potência e propriedades farmacológicas, ao associar com outros grupos funcionais de mesmo interesse, é possível que atuem sinergicamente no alvo biológico desejado (DUCHOWICZ et al. 2007).

Em 2006, Caballero e Fernández desenvolveram um estudo com 96 compostos com heterociclos, a fim de estabelecer novos modelos para atividade antifúngica em *C. albicans* através de estudos de SAR. Nele concluiu-se que a distribuição de polaridade, volume, massa influencia diretamente na potência do antifúngico.

O núcleo piperazina consiste em um anel de seis membros onde há 2 nitrogênios em posições 1 e 4. Esta configuração permite que haja uma maior área de superfície polar, rigidez estrutural e doadores e aceptores de hidrogênio, sendo mais favorável a maior especificidade e afinidade com o alvo, biodisponibilidade oral, solubilidade em água e melhorar as propriedades ADME. Esta estrutura foi classificada pela FDA entre os 3 N-heterociclos mais utilizados em medicamentos presentes na clínica, estando atrás somente da piperidina e piridina (TAYLOR et al, 2014; GETTYS et al. 2017).

Segundo Vekariya *et al* (2018), a piperazina possui uma extensa gama de atividades em que pode ser utilizado. Tal estrutura encontra-se presente em antifúngicos comerciais como itraconazol e posaconazol, e outros fármacos utilizados em diversas terapias distintas como quinolonas, imatinibe, quetiapina, sildenafil etc. A piperazina em si, também é utilizada como anti-helmíntico (GETTYS *et al* 2017; VIANA, 2007; TAYLOR *et al* 2014). Com isso a associação destas estruturas com tioureias tornam-se substâncias promissoras para novos agentes antimicrobianos (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2005; VEKARIYA *et al.*, 2019).

### **1.7. Estudos *in silico* de propriedades ADMETox**

Segundo Wouters e McKee (2020), o desenvolvimento de novos fármacos são demorados, cerca de 15 anos, e possuem alto custo, acima de 1 bilhão de dólares, sendo que 90% dos estudos são cessados nos testes clínicos e geralmente o fracasso está atrelado às propriedades farmacocinéticas, toxicológicas e a falta de eficácia (ALQAHTANI, 2017; YU; ADEDOYIN, 2003; WOUTERS, MCKEE, 2020).

As propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas impactam na segurança e eficácia de um medicamento, seja na biodisponibilidade daquele fármaco, tempo de meia-vida, dentre outras características especiais para populações específicas como tratamento em neonatos e crianças (ANKER *et al*, 2018). A farmacocinética consiste em um estudo desde a entrada do fármaco no corpo até a eliminação. Durante esse processo há as fases de absorção, distribuição, metabolização e por fim excreção, também conhecida como ADME. Parâmetros como biodisponibilidade, meia-vida, volume de distribuição e *clearance* são imprescindíveis para a avaliação da substância no organismo, bem como as características físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade, permeação na barreira hematoencefálica (BHE), interação com enzimas do citocromo P450, entre outras, que determinam as propriedades ADME das substâncias (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003; MODA, 2009).

Elucidando isto, a lipofilicidade encontra-se intimamente relacionada com a absorção oral do fármaco que necessita um coeficiente de partição (cLogP) que permita a passagem pela membrana plasmática, a regra dos 5 de Lipinski permite visualizar estas propriedades físico-químicas associadas a absorção e



biodisponibilidade oral (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003; MODA, 2009; LIPINSKI et al 2001; KATZUNG et al, 2014).

Já a farmacodinâmica compreende o estudo das ações do fármaco no corpo, de forma que para ocorrer é preciso da ligação do fármaco com o receptor. Esta pode promover ou inibir um efeito farmacológico, de forma que reversível ou irreversível. As ligações entre sítio alvo e fármaco se dão por ligações covalentes que promovem uma interação irreversível inativando tal receptor, ou ligações de hidrogênio que promovem interações fortes, entretanto reversíveis. As propriedades físico-químicas como número de doadores e aceptores de hidrogênio, área de superfície polar, permitem prever as possíveis interações com o sítio de ação no qual a estrutura faria interação (GONZÁLEZ-BELLO, 2016; MODA, 2003, KATZUNG et al, 2014)

O estudo da toxicidade *in silico* é definido pela Agência de Proteção Ambiental (EPA – em inglês) dos EUA como “integração da computação moderna e da tecnologia de informação com a biologia molecular a fim de melhorar a priorização de dados exigidos pela agência e avaliação de risco de produtos químicos”. Este estudo equivale cálculos que levam em consideração bancos de dados de substâncias ou fragmentos presentes em medicamentos comerciais e substâncias químicas a fim de identificar partes possivelmente tóxicas ao organismo, de forma que as análises feitas em fases primárias da pesquisa permitem identificar e fazer alterações ou descartá-la sem que chegue nas fases pré-clínicas e clínicas (ALQAHTANI, 2017; VALERIO, 2009).

O uso da modelagem molecular para o desenvolvimento de novos fármacos possibilita de identificar substâncias que não progrediriam nos estudos clínicos devido a características de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADME/Tox) e as excluindo ou modificando em etapas iniciais dos estudos. Para isso, faz-se uso de ferramentas computacionais, ou *in silico*, sendo possível prever e analisar os candidatos a fármacos e suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, metabolismo e potencial de toxicidade antes mesmo de testar *in vitro* e *in vivo*, assim otimizando o processo de descoberta de novos fármacos (ALQAHTANI, 2017; YU; ADEDOYIN, 2003). Esta ferramenta possui diversas vantagens, como um menor uso de animais, tempo e recursos para o estudo (MALTAROLLO et al., 2015).

O desenvolvimento de fármacos antes consistia em um processo demorado, que demandava tempo e dinheiro. Atualmente com o avanço da química medicinal e das tecnologias aplicadas a estes estudos, a indústria farmacêutica e os centros de pesquisa em universidades buscam através de ferramentas computacionais um bom equilíbrio entre as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Isso ocorre com os estudos de relação estrutura-atividade (SAR em inglês) onde é possível relacionar dados químicos e biológicos a fim de desenvolver entidades químicas que tenham maior efetividade (ALQAHTANI, 2017; MALTAROLLO et al., 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas invasivas vem crescendo drasticamente nas últimas décadas, sendo de grande impacto na saúde humana. Isso ocorre devido ao aumento progressivo de pacientes imunocomprometidos, sejam pacientes internados em UTIs, sob tratamento antineoplásico, transplantados, entre outros, que leva a susceptibilidade a infecções fúngicas oportunistas (FIOCRUZ, 2019; CDC, 2020.; BONGOMIN, et al 2017; BAPTISTA, et al. 2020).

Dessa forma, as infecções fúngicas estão contidas nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e tem se tornado uma problemática presente no ambiente nosocomial, vide que podem ser transmitidas por mãos de profissionais de saúde e equipamentos contaminados (BAPTISTA, et al. 2020). Elas estão relacionadas com altas taxa de morbidade e mortalidade e ainda não há o reconhecimento do impacto, nem investimentos necessários para monitoramento e notificação dessas patologias tão presentes no ambiente hospitalar (FIOCRUZ, 2019)

O gênero *Candida* spp. é o quatro principal agente causador de infecções sistêmicas, e afeta em torno de 250 mil pessoas no mundo anualmente (KULLBERG, B. J., ARENDRUP, M.C., 2015). Esta pode acometer órgãos, tecidos e se disseminar pela corrente sanguínea, chamada de candidemia (BHATTACHARYA, 2020; VIEIRA, 2017). O arsenal de medicamentos para o tratamento destas infecções é escasso e com o aumento de resistência das cepas aos fármacos utilizados se torna ainda mais restrito. Este fato relaciona-se com o uso exacerbado de antifúngicos por pacientes, na agricultura e uso veterinário, a venda indiscriminada, prescrição indevida e uso errôneo, principalmente dos azóis (NIGAM, 2015; MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2008)

As tioureias possuem diversas aplicações sendo estudadas, sendo o potencial antifúngico uma delas. Esta classe possui uma estrutura favorável para fazer diversas interações, como a complexação, ligações covalentes e ligações de hidrogênio. Os heterociclos demonstram suma importância farmacêutica, vide que atuam como farmacóforos ativos no desenvolvimento dos fármacos (MANNAN *et. al.* 2019), na clínica é possível observar a presença destes em diversas terapias. Entretanto, a ação destes quando relacionada a outro grupo funcional com o mesmo interesse biológico tende a uma ação mais ampla (DUCHOWICZ *et al.*, 2007). Nesse panorama, faz-se necessária a busca por novos antifúngicos que tenham

propriedades farmacocinéticas, eficácia e segurança adequadas para o uso clínico, sejam de amplo espectro e possuam baixa toxicidade (GURGUÍ, CUENCA-ESTRELLA, 2008; BERGOLD, A. M., GEORGIADIS, S. 2004)

### 3. OBJETIVO

#### Objetivo Geral

Avaliar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológica *in silico* e atividade antifúngica em espécies de *Candida in vitro* de derivados de tioureias para a descoberta de novos candidatos a fármacos.

#### Objetivos específicos

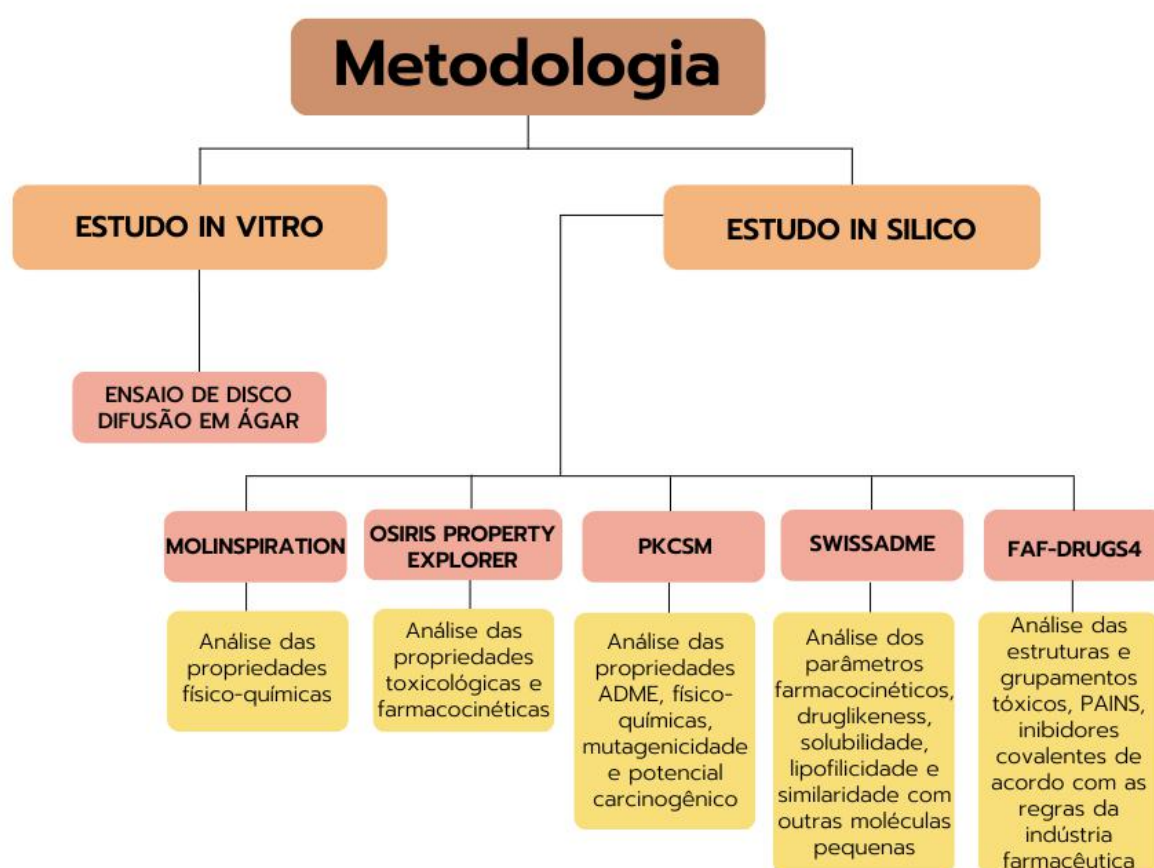
Avaliar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas *in silico* dos derivados de tioureias.

Averiguar se os derivados de tioureias estão de acordo com as regras das indústrias farmacêuticas para novos candidatos a fármacos.

Avaliar qualitativamente *in vitro* a atividade dos derivados de tioureias contra espécies de *Candida*.

## 4. METODOLOGIA

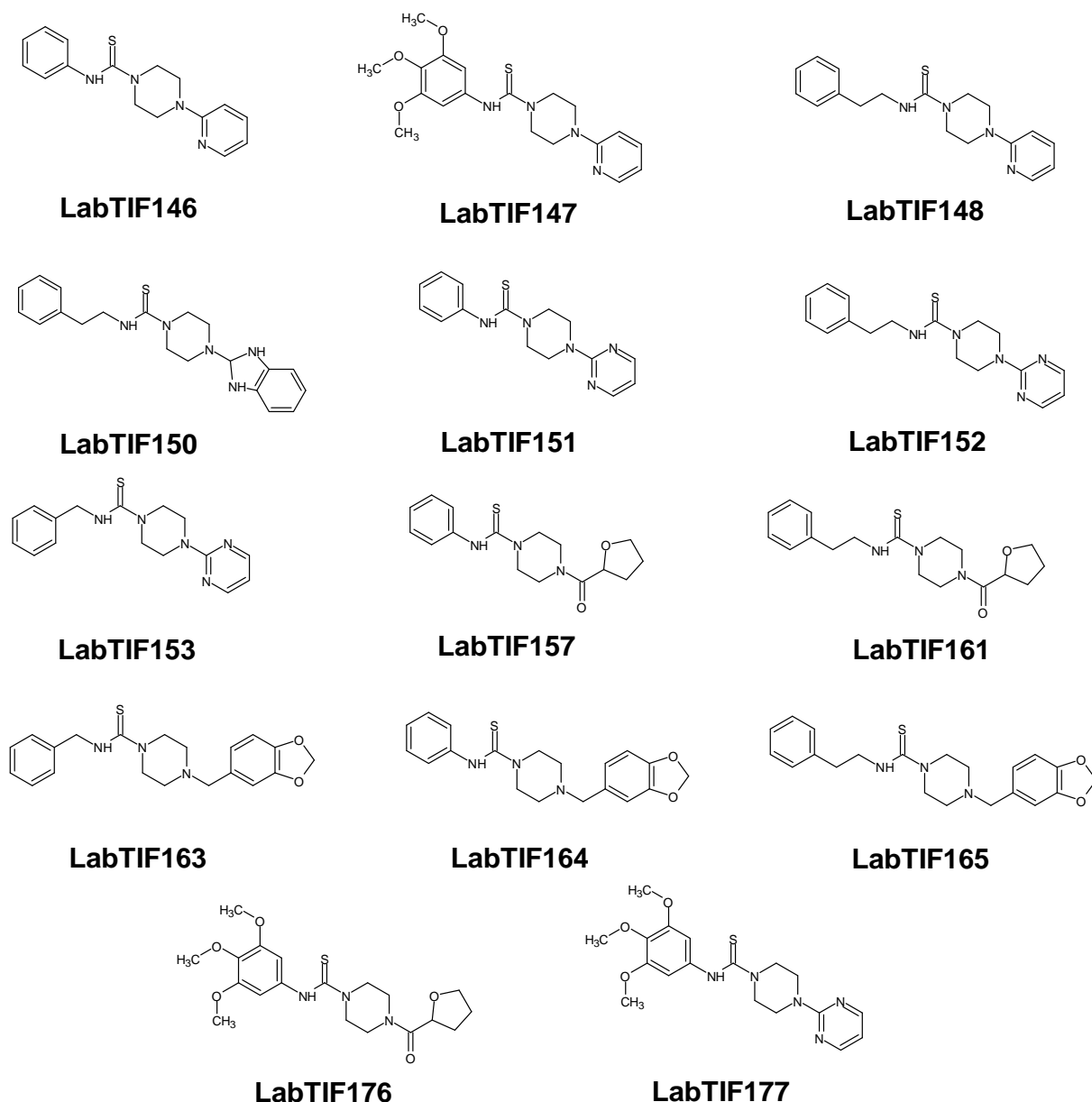
O desenvolvimento do presente estudo foi delineado a partir de ensaios *in vitro*, que avaliaram a atividade antifúngica dos derivados de tioureias mostrando assim as estruturas que apresentaram atividade frente as cepas de *Candida spp.* e ensaios *in silico* que avaliaram as propriedades farmacocinéticas, toxicológicas e requisitos frente aos estabelecidos pelas indústrias farmacêuticas. No fluxograma abaixo é demonstrado o teste realizado e os softwares utilizados para calcular as propriedades desejadas.



**Figura 8.** Fluxograma referente à metodologia

### 4.1. Obtenção dos derivados de tioureia contendo piperazina

Foram utilizados 14 derivados de tioureias contendo piperazina sintetizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa do professor Lucio Mendes Cabral da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.



**Figura 9.** Estruturas de derivados de tioureias com núcleo piperazina

## 4.2. Análise *in silico* dos derivados de tioureias contendo piperazina

### 4.2.1. Análise das propriedades físico-químicas

Inicialmente, o *software* Molinspiration® (<https://www.molinspiration.com>), foi utilizado a fim de desenhar as estruturas para obter os códigos SMILES, seguido da análise das propriedades físico-químicas calculada neste servidor. Além do Molinspiration®, foi utilizado o pkCSM® do BiosigLab na Universidade de Melbourne (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>), cujos principais dados calculados são as propriedades farmacocinéticas, mas também apresentam dados físico-químicos das substâncias de estudo. Estes servidores calculam propriedades como massa

molar, volume, número de ligações rotacionáveis, área de superfície polar, número de doadores e aceptores de hidrogênio e LogP, descritores importantes para cálculos de absorção do potencial fármaco, permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE), biodisponibilidade, locais onde pode haver ligações de hidrogênio na molécula, entre outros.

#### **4.2.2. Análise das propriedades farmacocinéticas**

Os *softwares* pkCSM® e SwissADME® (<http://www.swissadme.ch>), servidor do Instituto Suíço de bioinformática, foram utilizados a fim de prever e otimizar as propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Assim como nos parâmetros preditos nos tópicos anteriores, neste permite prever as propriedades ADMET, de forma que é possível descobrir em estágios iniciais de desenvolvimento uma farmacocinética não favorável, assim não dando continuidade aos testes pré-clínicos e clínicos. Além disso, estas análises podem gerar diversos compostos promissores.

#### **4.2.3. Avaliação da toxicidade *in silico***

As propriedades toxicológicas computacionais teóricas foram avaliadas por meio dos servidores OSIRIS Property Explorer® (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), pkCSM® e o FAF-Drugs4® (<https://fafdrugs4.rpbs.univ-paris-diderot.fr/>). O primeiro abrange as propriedades toxicológicas como mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritantes e reprodutivos, utilizando as cores vermelho, amarelo e verde para representar alto, médio e baixo risco, respectivamente. O segundo aborda a mutagenicidade a partir da toxicidade de AMES, potencial carcinogênico, hepatotoxicidade, inibidores do gene hERG I e II, genes responsáveis pela codificação de canais de potássio. No último é possível identificar nas substâncias grupamentos potencialmente tóxicos, inibidores covalentes, PAINS. Essa plataforma busca os toxicóforos, possíveis inibidores de interações entre proteínas, predição da indução de fosfolipidose pelo fármaco.



#### 4.2.4. Análise das regras da indústria farmacêutica

As estruturas foram submetidas ao servidor FAF-Drugs4, onde as substâncias são avaliadas de acordo com as regras preconizadas por indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos, como as regras de Lipinski, Pfizer 3/75, GSK 4/400, Lilly, entre outros. Este se baseia em algumas regras como na “Regra dos cinco” de Lipinski, que exprime que maior absorção e permeabilidade do fármaco esta possivelmente relacionada com os critérios físico-químicos descritos por esta lei, onde o coeficiente de partição ( $\text{LogP}$ )  $\leq 5$ , massa molar  $\leq 500$ , número de aceptores de ligação de hidrogênio  $\leq 10$  e número de doadores de ligação de hidrogênio  $\leq 5$ , além disso o programa fornece dados como a área de superfície polar (TPSA) que se mostra um bom descritor para cálculos de absorção do possível fármaco, permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE), biodisponibilidade, entre outros.

Além desta, há a regra 3/75 da Pfizer que contempla uma análise de 245 substâncias com dados toxicológicos e sugestões de candidatos a fármacos com  $\text{cLogP}$  menor que 3 e TPSA superior a 75 Å. Esta regra leva em consideração esses parâmetros devido a menor possibilidade de efeitos tóxicos em baixas concentrações. A regra 4/400 da GSK preconiza que compostos cujo  $\text{logP}$  for maior que 4 e massa molar superior a 400 Daltons são menos favoráveis a um perfil seguro para o medicamento. Outra regra pertinente na indústria farmacêutica é a de Lilly, que abrange 275 regras que identificam e rejeitam compostos reativos, como estruturas instáveis, sem oxigênio e nitrogênio presente na estrutura, presença de oxidantes, detergentes, entre outros.

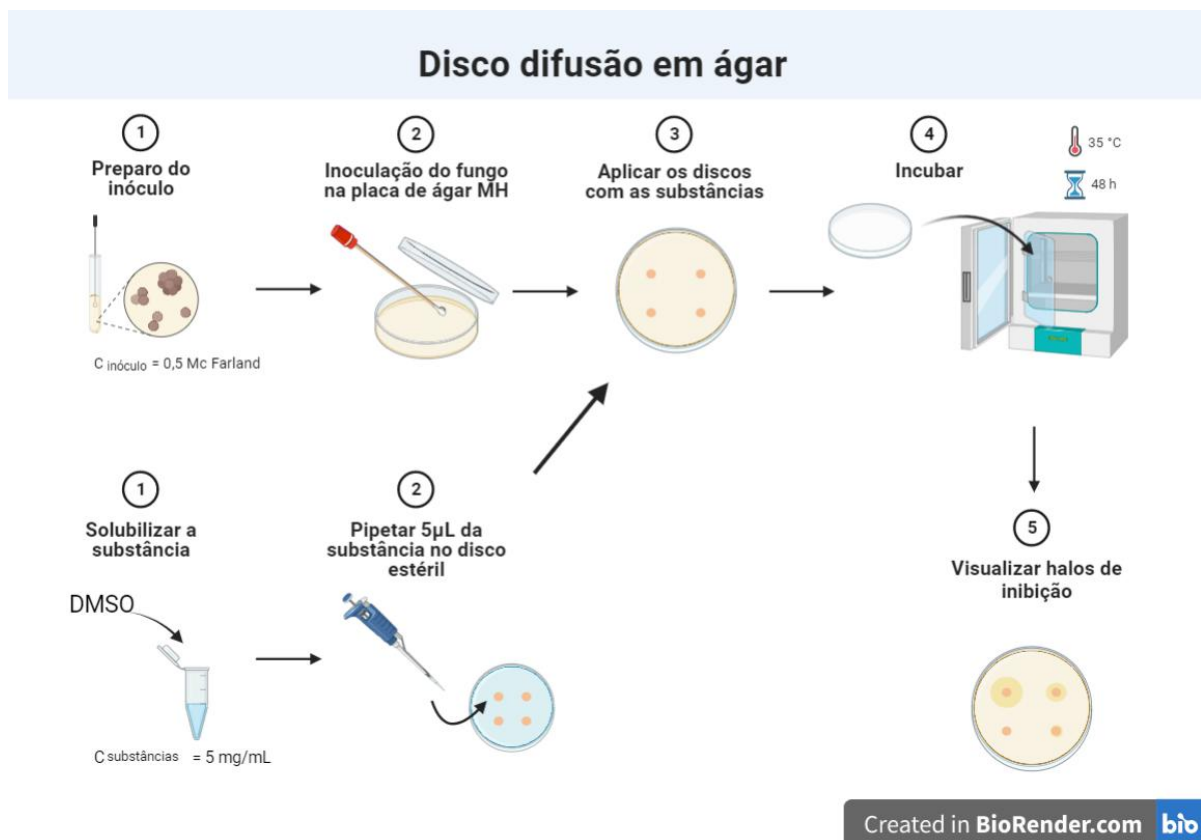
### 4.3 Avaliação da atividade antifúngica

#### 4.3.1 Teste de disco difusão em ágar

O método de Disco difusão em ágar foi realizado com base no protocolo do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI) M44-A2 (CLSI, 2010) para leveduras. Foram utilizadas cepas padrão da coleção americana (American Type Culture Collection, ATCC) das espécies *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida albicans* (ATCC 40227) e *Candida krusei* (ATCC 34135) fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Cepas das leveduras

congeladas foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 35°C por 24h. A partir desta cultura, os inóculos foram preparados na escala 0,5 de McFarland.

As substâncias testadas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 5 mg/mL. Posteriormente, foram adicionados 5 µL dessa solução nos discos estéreis, os quais foram mantidos em placa com ágar Müller Hinton e o inóculo, sendo incubada a 35°C por 48 h. A fim de avaliar a sensibilidade do fungo aos derivados de tioureia, foi mensurado pelo diâmetro do halo de inibição em milímetros, utilizado como controles positivo o fluconazol e o cetoconazol, e o DMSO como controle negativo. Esse experimento foi realizado em triplicata, e o valor utilizado de halo de inibição foi obtido através da média das triplicatas.



**Figura 10.** Representação esquemática do ensaio de disco difusão em ágar

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise *in silico* dos derivados de tioureias contendo piperazina

#### 5.1.1. Análise das propriedades farmacocinéticas

As propriedades físico-químicas são imprescindíveis para o desenvolvimento de um fármaco, de forma que contribuem para a farmacocinética do candidato em estudo. As substâncias derivadas de tioureias **labTIF146** e **labTIF164** (tabela 1), que apresentaram atividade antifúngica *in vitro*, possuem fatores físico-químicos que corroboram para tais valores, o logP permite avaliar a lipofilicidade da estrutura, que interfere na capacidade do fármaco de atravessar a membrana plasmática. Os compostos ativos, apresentaram valores de 2,57 e 2,83 respectivamente de cLogP. Em comparação com as estruturas mais similares a elas, a **labTIF148** se assemelha estruturalmente da **labTIF146** pela presença do anel piridina ligado a piperazina, e um anel aromático ligado a tioureia, já a **labTIF164** se assemelha estruturalmente com a **labTIF165** pela presença do 5 metil-1,3-benzodioxol ligado a piperazina, e um anel aromático ligado a tioureia. Ambas as estruturas se diferem apenas pela presença de 2 carbonos espaçadores entre o fenil e a tioureia de forma que se torna evidente a ausência destes levaram a uma ação antifúngica.

A área de superfície polar (TPSA) consiste na área ocupada por átomos de nitrogênio e oxigênio, sejam eles ligados ou não a hidrogênio, que possuem a capacidade de formação das ligações de hidrogênio e à polaridade. Estas estão correlacionadas com o processo de absorção, na interação entre a molécula e a superfície da membrana celular e a migração desta para o interior da célula. As substâncias em estudo apresentaram um TPSA entre 63,49 e 104,59, segundo Pajouhesh e Lenz (2005), estas características permitem associar que TPSA abaixo de 90 Å são mais propícios a permearem a barreira hematoencefálica (BHE), os com valores maiores que 140 Å demonstram menor permeabilidade pela membrana plasmática (ANTIPENKO et al 2018). Dessa forma, as estruturas que apresentaram atividade antifúngica são mais favoráveis de permear a barreira hematoencefálica, característica interessante e promissora em um tratamento de infecções como a meningite fúngica, ainda que todas as tioureias apresentem um TPSA abaixo de 90 Å, exceto **labTIF147**, **labTIF176** e **labTIF177**, que foram respectivamente 91,18 Å, 104,59 Å e 104,07 Å que ainda assim conseguem permear a membrana plasmática.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos de derivados de tioureias com núcleo piperazina: massa molar (MM), coeficiente de partição octanol-água (cLogP), número de aceptores de ligação de hidrogênio (nON), número de doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH), solubilidade em água (LogS), Área de superfície polar topológica (TPSA), número de ligações rotacionáveis (nrotb) e absorção intestinal humana teórica (HIA%)

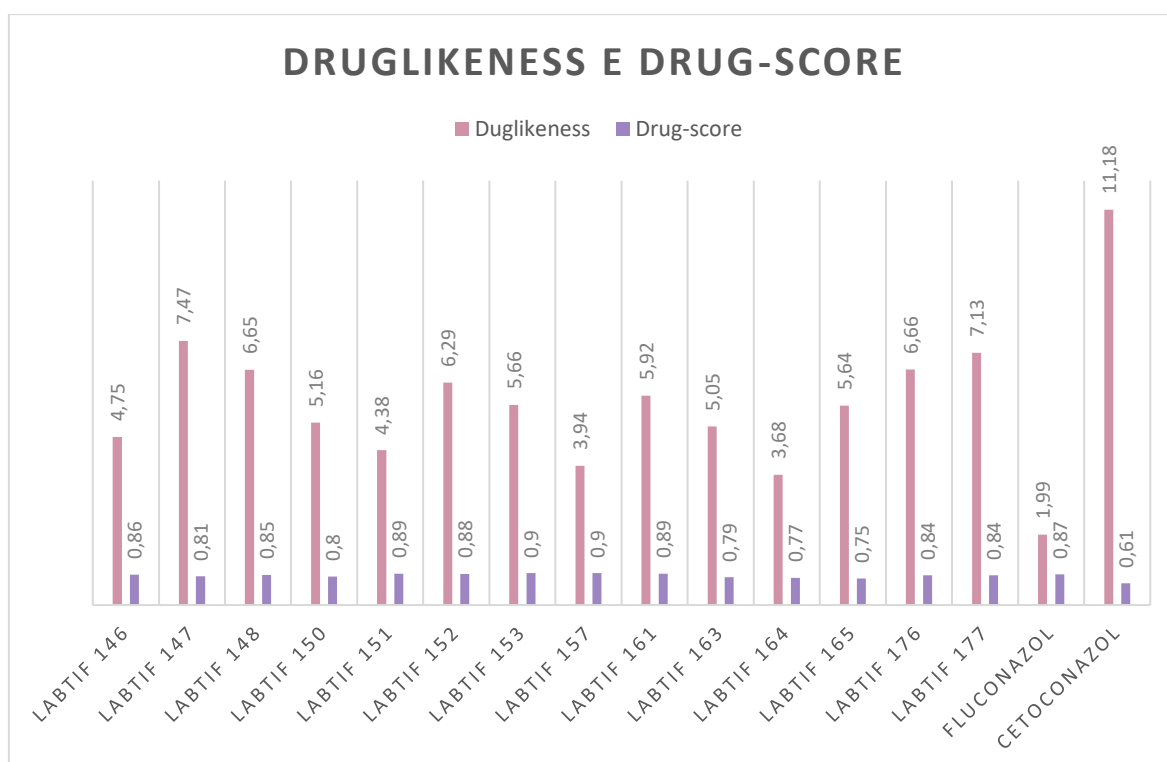
Substância	cLogP	MM	nON	nOHNH	LogS	TPSA	nrotb	HIA%
labTIF146	2,57	298,41	4	1	-3,27	63,49	4	93,30
labTIF147	2,48	388,48	7	1	-3,52	91,18	7	94,66
labTIF148	2,96	326,46	4	1	-3,53	63,49	6	95,06
labTIF150	3,6	365,50	5	2	-4,20	79,28	6	85,45
labTIF151	1,92	299,39	5	1	-2,88	76,38	4	93,62
labTIF152	2,31	327,45	5	1	-3,13	76,38	6	95,38
labTIF153	1,85	313,42	5	1	-2,84	76,38	5	94,74
labTIF157	1,39	319,42	5	1	-2,54	76,90	4	92,48
labTIF161	1,78	347,48	6	1	-2,81	76,90	6	80,62
labTIF163	3,76	369,48	5	1	-3,65	69,06	6	92,07
labTIF164	2,83	355,45	5	1	-3,69	69,06	5	92,09
labTIF165	3,23	383,51	5	1	-3,96	69,06	7	92,75
labTIF176	1,30	409,50	8	1	-2,82	104,59	7	95,33
labTIF177	1,83	389,47	8	1	-3,12	104,07	7	95,01
Fluconazol	0,50	306,27	7	1	-2,07	81,65	5	94,96
Cetoconazol	4,35	531,43	8	0	-5,61	69,00	7	93,18

Posteriormente foram calculadas no *software* PKCSM as propriedades farmacocinéticas das estruturas avaliadas no presente estudo. A absorção intestinal humana teórica calculada foi alta, sendo todas as 14 substâncias acima de 80%. As substâncias que apresentaram atividade antifúngica obtiveram absorção intestinal humana teórica de 93,30% para a **labTIF146** e 92,1% para a **labTIF164**, estas se assemelham aos valores encontrados nos controles de cetoconazol (93,2%).

Nos estudos *in silico* foram avaliados os potenciais de *drug-score* e o *druglikeness* no *software* OSIRIS Property Explorer, e comparados com os fármacos fluconazol e cetoconazol já presentes no mercado. O *druglikeness* é baseado em uma lista de fragmentos presentes em fármacos comercializados e produtos químicos, essa lista foi criada a partir dos fragmentos de 3300 medicamentos e 15000 produtos químicos comercializados pela Fluka®. Ele pode apresentar de valores negativos a positivos, sendo que valores maiores desse parâmetro indicam que a estrutura apresenta fragmentos presentes em fármacos comercializados (Baalakrishnan et al. 2015). O *drug-score* combina as propriedades de cLogP, logS,

massa molar, druglikeness e toxicidade a fim de avaliar o potencial da substância para tornar-se um fármaco. Esse parâmetro pode apresentar valores entre 0 e 1, uma pontuação 1 ou próxima de 1, indica um excelente candidato para ser um fármaco.

Dentre os resultados de *druglikeness* encontrados para os derivados de tioureias os valores se encontraram entre 3,68 e 7,47 e o *drug-score* entre 0,75 e 0,9. Comparando com os valores dos fármacos utilizados como padrão, o fluconazol apresentou um *druglikeness* abaixo dos valores encontrados para os derivados de tioureias (figura 11), já o cetoconazol apresentou um valor de 11,18. Em relação ao *drug-score* os valores padrões foram de 0,87 e 0,61, respectivamente. O **labTIF146** e **labTIF164** apresentaram *druglikeness* de 4,75 e 3,68, e *drug-score* de 0,86 e 0,77, respectivamente. Estes não foram avaliados com os melhores valores encontrados para a série de derivados de tioureias, mas encontram-se na margem dos valores de referência do fluconazol e cetoconazol.



**Figura 11.** *Druglikeness* e *drug score* dos derivados de tioureias

Dessa forma, todos os derivados de tioureias apresentaram bons valores de *drug-score* (acima de 0,7) e de *druglikeness* também, visto que as 14 substâncias apontaram valores positivos, portanto, sugere uma boa farmacocinética e perfil

toxicológico devido à presença de fragmentos presentes em fármacos comerciais. Estes valores podem estar associados com a presença do anel piperazina, um heterociclo utilizado na clínica como antihelmíntico, além de estar presente em diversas estruturas como em quinolonas, assim como o grupo funcional tioureia presente no metimazol utilizado na terapia de hipertireoidismo (ZAMBRANA et al., 2015).

A análise dos resultados *in silico* demonstrou que as estruturas **labTIF147**, **labTIF151**, **labTIF152**, **labTIF153**, **labTIF157**, **labTIF161**, **labTIF176** e **labTIF177**, se mostraram promissoras frente as suas características farmacocinéticas, *drug-score*, *druglikeness* e sem alerta de risco. Ainda que algumas estruturas apresentem alertas em algum parâmetro, é preciso analisar se os pontos fortes e características favoráveis para um candidato a fármaco sobressaem aos pontos de melhoria da estrutura. Dessa forma, as outras estruturas não devem ser descartadas visto que é passível de modificações a fim de melhorar suas características farmacocinéticas e toxicidade, tendo em vista que os estudos farmacocinéticos e toxicológicos são realizados em estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (AMORIM; PESTANA; MENDES, 2017).

### 5.1.2. Avaliação da toxicidade *in silico*

Em relação a toxicidade teórica das estruturas, foram avaliadas por meio dos softwares Osiris Property Explorer e PKCSM. Nestes, as substâncias apresentaram baixos risco de mutagenicidade, tumorigenicidade, de efeitos irritantes e reprodutivos (tabela 2). Apenas a substância **labTIF150** foi predita positiva para toxicidade de AMES. Todos apresentaram hepatotoxicidade, assim como os fármacos já conhecidos como fluconazol e cetoconazol a fim de comparação. A hepatotoxicidade se mostra como um grande desafio no desenvolvimento de fármacos, onde pode acarretar lesões induzidas por medicamentos (DILI- em inglês *Drug induced liver injury*) no fígado (TESCKE, 2019; SOMCHIT, et al 2004).

Além disso, foram calculadas a inibição de canais de potássio codificados pelo gene hERG I e II, a inibição destes canais prologa o intervalo QT, podendo levar a uma arritmia ventricular. Dentre os 14 compostos, nenhum apresentou inibição em hERG I, entretanto, 50% apresentaram inibição em hERH II, assim como cetoconazol, tais resultados estão demonstrados na tabela 4.

**Tabela 2.** Classificação da toxicidade de derivados de tioureias contendo o anel piperazina: Mutagenicidade (Mutag.), Tumorigenicidade (Tumorig.), Efeitos irritantes (ef. Irritantes), efeitos reprodutivos (ef. Reprod.), Hepatotoxicidade (hepatotox.), inibidor hERGI (inib. hERGI), inibidor hERGII (inib. hERGII), toxicidade de AMES (Tox de AMES)

Estruturas	Mutagen	Tumorig	Ef. Irritante	Ef. Reprod	Hepatotox	Inib. Hergi	Inib. Herg II	Tox. De AMES
<b>Labtif146</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Labtif147</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Labtif148</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não
<b>Labtif150</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Sim
<b>Labtif151</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Labtif152</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Labtif153</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Labtif157</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Labtif161</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não
<b>Labtif163</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não
<b>Labtif164</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não
<b>Labtif165</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não
<b>Labtif176</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não
<b>Labtif177</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Fluconazol</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Não	Não
<b>Cetoconazol</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Sim	Não	Sim	Não

### 5.1.3. Análise das regras da indústria farmacêutica

As substâncias derivadas de tioureias foram analisadas com base na regra de Lipinski, utilizada para mensurar a biodisponibilidade oral dos candidatos a fármacos. Seguindo essa regra, para que sejam aprovados é preciso que os valores dados estejam de acordo com pelo menos três parâmetros físico-químicos, como a massa molar menor que 500 daltons, logP calculado ou coeficiente de partição menor que 5, possuir menos que 5 doadores de ligação de hidrogênio e menos que 10 aceptores de hidrogênio, além das extensões desta regra, é considerada a relevância dessa, bem como a disponibilidade durante os ensaios clínicos a fim de verificar que as moléculas em estudos são bioativas (LIPINSKI et al. 2001). Assim a partir disso, todas as 14 substâncias analisadas cumprem os critérios exigidos por Lipinski, de forma que se sugere uma boa biodisponibilidade oral (tabela 5).

As substâncias também foram avaliadas a partir de regras utilizadas em algumas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de fármacos, como a GSK 4/400, Pfizer 3/75 e Lilly. Na primeira é analisado parâmetros como biodisponibilidade, solubilidade, ligação ao plasma sanguíneo, permeabilidade,

penetração no sistema nervoso central, ligação ao tecido cerebral, inibição de enzimas do citocromo P450 e do gene hERG a fim de verificar a toxicidade. Nesta regra as substâncias são classificadas como pouco tóxicos quando  $\log P < 4$  e  $MM < 400$  Da (GLEESON, 2008). A segunda, analisa a partir de relações entre propriedades físico-químicas e a toxicidade fazendo uso de dados de estudo *in vivo* pré-clínicos em ratos e cachorros. (HUGHES et al, 2008). E a regra de Lilly, consiste em 275 regras utilizadas a fim de identificar substâncias ou parte delas que possam interferir com os ensaios biológicos.

Com isso, analisando os resultados fornecidos pelo FAFDrugs4, todos os compostos foram avaliados com bom pela regra GSK 4/400. Pela regra da Pfizer 3/75 as estruturas **labTIF147**, **labTIF151**, **labTIF152**, **labTIF153**, **labTIF157**, **labTIF161**, **labTIF176** e **labTIF177** foram classificadas como bom, estando dentro dos parâmetros estabelecidos por eles, assim como o fluconazol. As substâncias **labTIF146**, **labTIF148**, **labTIF150**, **labTIF163** e **labTIF164** apresentaram um alerta em relação a regra 3/75 da Pfizer, isto pode estar relacionado com um dos parâmetros estar fora do exigido pela indústria. Apenas a **labTIF165** foi classificada como ruim, assim como o cetoconazol, entretanto não se deve descartar vide que o fármaco comercial se encontra dentro das mesmas condições do candidato a fármaco (tabela 3).

Todas as estruturas foram aprovadas pela regra de Lilly e Lipinski e nenhuma foi classificada pelo servidor como PAINS, ou seja, compostos capazes de interferirem nos testes, passíveis de causar resultados falso-positivos (BAELL e HOLLOWAY, 2010). Outra predição deste software foi o alerta para o grupamento tiocetona que corresponde ao grupo funcional da tioureia, ele foi rejeitado devido a possibilidade de ele inibir covalentemente os sítios de ação. Este resultado deve ser observado com cautela tendo em vista que há fármacos que são utilizados na clínica e promovem uma inibição irreversível, como os antibióticos beta-lactâmicos que atuam promovendo uma inibição irreversível da D,D-carboxipeptidase (FISHER et al 2005).

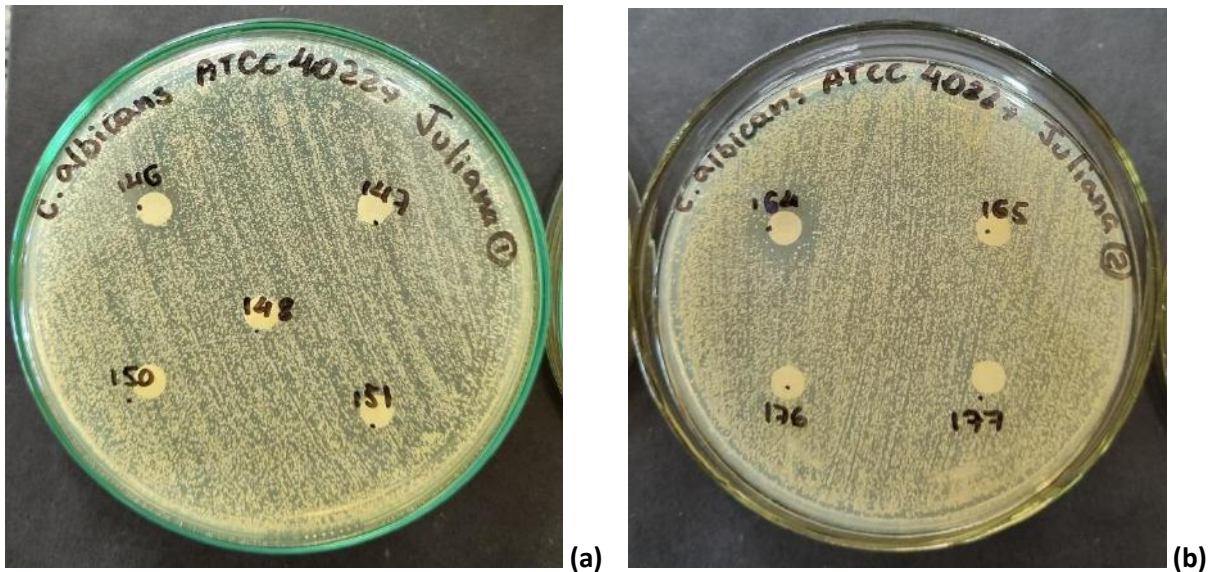


**Tabela 3.** Classificação de derivados de tioureias de acordo com as regras da indústria farmacêutica pelo software FAFDrugs4 para segurança do fármaco (GSK4 / 400, Pfizer 3/75, Lilly e regra dos 5 de Lipinski)

Substância	Regra dos 5 de Lipinsky	GSK 4/400	Pfizer 3/75	Lilly	PAINS	Alerta
<b>labTIF146</b>	Aceito	Bom	Alerta	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF147</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF148</b>	Aceito	Bom	Alerta	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF150</b>	Aceito	Bom	Alerta	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF151</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF152</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF153</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF157</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF161</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF163</b>	Aceito	Bom	Alerta	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF164</b>	Aceito	Bom	Alerta	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF165</b>	Aceito	Bom	Ruim	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF176</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>labTIF177</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Inibidor covalente
<b>Fluconazol</b>	Aceito	Bom	Bom	Aceito	Não	Halogênio de baixo risco
<b>Cetoconazol</b>	Aceito	Ruim	Ruim	Não Aceito	Sim	Halogênio de baixo risco

## 5.2. Análise da atividade antifúngica

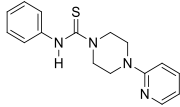
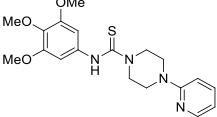
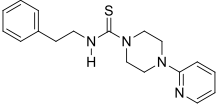
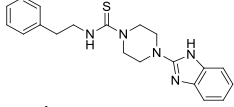
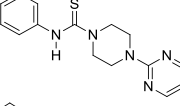
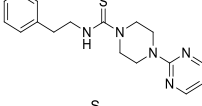
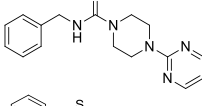
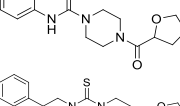
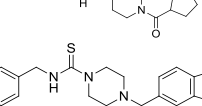
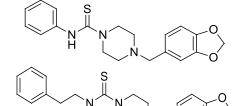
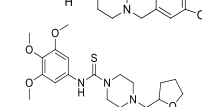
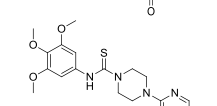
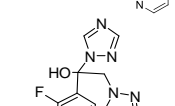
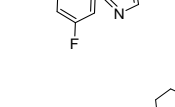
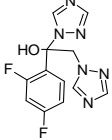
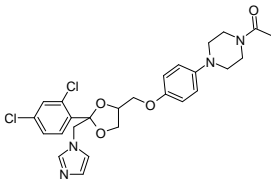
Os 14 derivados de tiureia contendo piperazina foram submetidos à avaliação da atividade antifúngica para 3 espécies de *Candida* diferentes por meio do ensaio de disco-difusão em ágar (tabela 2) em comparação aos controles fluconazol e cetoconazol. Para as espécies de *C. krusei* e *C. glabrata* não houve inibição com as substâncias em questão. Em relação a *C. albicans*, 2 substâncias, **labTIF146** e **labTIF164**, apresentaram atividade antifúngica (figura 12). A fim de demonstrar melhor a atividade antifúngica, faz-se necessário o estudo quantitativo de micro diluição em caldo para determinar a concentração mínima inibitória necessária para tal atividade.



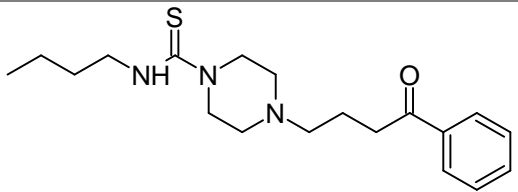
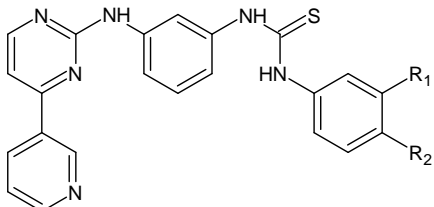
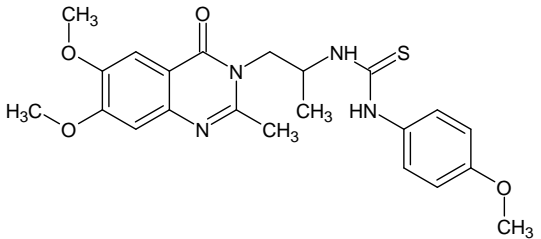
**Figura 12.** Fotos dos ensaios de disco difusão em ágar com presença de halo de inibição em *C. albicans* em labTIF146 (a) e labTIF164 (b)

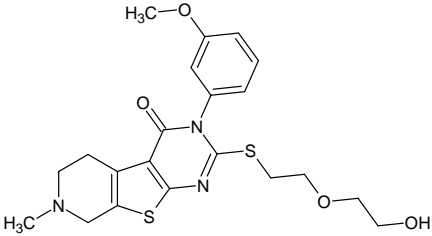
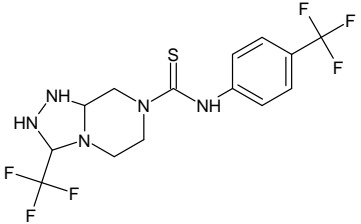
Mohamed e El-Ghany (2012), também demonstraram atividade antifúngica do derivado de tioureia **1f** sobre a espécie *C. albicans*, com halo de inibição entre 9 e 20 mm. Esta atividade demonstra suma relevância vide que gênero *Candida* é uma das principais causas de infecções sistêmicas em humanos, sendo a *Candida albicans* o principal agente causador de candidemias (MOHAMED; ABD EL-GHANY, 2012; VARANO et al., 2019). Dentre as estruturas que apresentaram atividade em nosso estudo, ambas possuem o grupamento fenil e um heterociclo ligados ao grupo principal de tioureia concomitante ao heterociclo piperazina, sendo o **LabTIF146** ligado a uma piridina e um fenil, e o **labTIF164** ligado a um fenil e um 5-metil-1,3-benzodioxol espaçado por um grupamento metil (quadro 1).

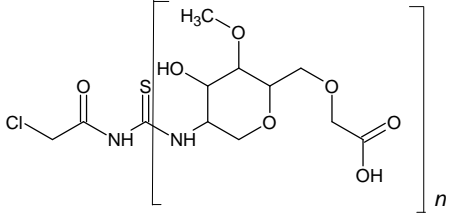
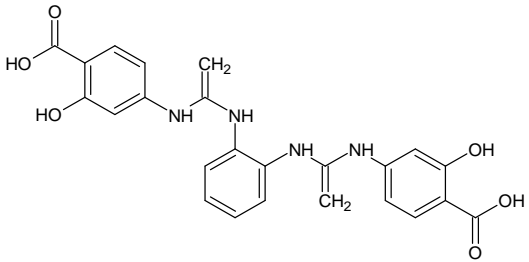
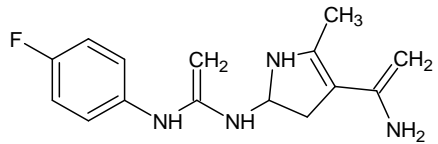
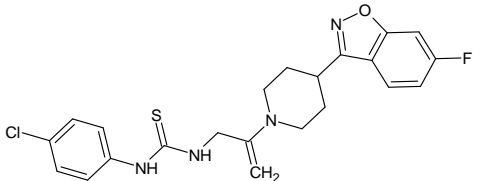
**Tabela 4.** Atividade antifúngica de derivados de tioureias com núcleo piperazina nos testes de disco difusão com medida dos halos de inibição.

Substâncias	Estrutura química	<i>C. krusei</i> Halo(mm)	<i>C. albicans</i> Halo (mm)	<i>C. glabrata</i> Halo (mm)
labTIF146		0	11	0
labTIF147		0	0	0
labTIF148		0	0	0
labTIF150		0	0	0
labTIF151		0	0	0
labTIF152		0	0	0
labTIF153		0	0	0
labTIF157		0	0	0
labTIF161		0	0	0
labTIF163		0	0	0
labTIF164		0	12	0
labTIF165		0	0	0
labTIF176		0	0	0
labTIF177		0	0	0
Fluconazol		25	38	20
Cetoconazol		40	55	50

**Quadro 1.** Resultados obtidos para estruturas derivadas de tioureias com atividade antifúngica descrita na literatura.

Código	Estruturas	Microrganismos	Avaliação MIC	Citação
1a		<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Aspergillus fumigates</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> : 74,8 µM; <i>C. neoformans</i> : 9,34 µM <i>T. mentagrophytes</i> : 9,34 µM Padrão (fluconazol): 3,26 µM ( <i>C. albicans</i> ); 6,53 µM ( <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> e <i>C. parapsilosis</i> ); > 81,2 µM ( <i>T. mentagrophytes</i> e <i>A. fumigates</i> )	Bala, 2015
1b	 <p>Sendo R1= 3-cloro (3h) ou 3-trifluorometil (3i), e R2= 4-fluoro (3g)</p>	<i>Candida albicans</i> e <i>Candida nonalbicans</i>	<i>C. albicans</i> : 13,18 µg/mL (3g); 14,2 µg/mL (3h), 16,6 µg/mL (3i). <i>C. nonalbicans</i> : 15,28 µg/mL (3g); 18,18 µg/mL (3h); 16,36 µg/mL Padrão (anfotericina B): 16,4 µg/mL ( <i>C. albicans</i> ); 18,6 µg/mL ( <i>C. nonalbicans</i> )	Chandrasekhar, 2018
1c		<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium solani</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	<i>C. albicans</i> : 35 µg/mL <i>A. niger</i> : 35 µg/mL <i>F. solani</i> : 30 µg/mL <i>A. flavus</i> : 40 µg/mL Padrão (Miconazol): 20 µg/mL ( <i>C. albicans</i> ); 15 µg/mL ( <i>A. niger</i> ); 15 µg/mL ( <i>F. solani</i> ); 20 µg/mL ( <i>A. flavus</i> )	Keche, 2019

Código	Estruturas	Microrganismos	Avaliação MIC	Citação
1d		<p><i>Aspergillus fumigatus</i>,  <i>Aspergillus versicolor</i>,  <i>Aspergillus ochraceus</i>,  <i>Aspergillus niger</i>,  <i>Trichoderma viride</i>,  <i>Penicillium funiculosum</i>,  <i>Penicillium ochrochloron</i>, and  <i>Penicillium verrucosum</i> var.  <i>cyclopium</i></p>	<p><i>A. fumigatus</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC); <i>A. versicolor</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC)  <i>A. ochraceus</i>: 0,027 mM (MIC), 0,058 mM (MFC); <i>A. niger</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC); <i>T. viride</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC); <i>P. funiculosum</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC); <i>P. ochrochloron</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC); <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>: 0,027 mM (MIC), 0,056 mM (MFC);  Padrão (Cetoconazol): 0,376 mM (MIC) e 0,941 mM (MFC) (<i>A. fumigatus</i>, <i>A. versicolor</i>, <i>A. niger</i>, <i>P. funiculosum</i>); 0,282 mM (MIC) e 0,376 mM (MFC) (<i>A. ochraceus</i>); 1,882 mM (MIC) e 2,822 mM (MFC) (<i>T. viride</i> e <i>P. ochrochloron</i>); 2,882 mM (MIC) e 3,763 mM (MFC)</p>	<p>Magoulas, G.E. et al 2020</p>
1e		<p><i>Candida albicans</i> e  <i>Cryptococcus neoformans</i></p>	<p><i>C. albicans</i>: 6,25 µg/mL  <i>C. neoformans</i>: 6,25 µg/mL   Padrão (Fluconazol): 3,125 µg/mL</p>	<p>Mannam, M.R. et al 2019</p>

Código	Estruturas	Microrganismos	Avaliação MIC	Citação
1f		<i>Aspegillus Fumigatus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> e <i>Candida albicans</i>	<i>A. fumigatus</i> : 7,8 µg/mL <i>G. candidum</i> : 15,6 µg/mL <i>C. albicans</i> : 62,5 µg/mL	Mohamed e El-Ghany, 2012
1g		<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Microsporium nanum</i> , <i>Microsporium cookei</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton ajelloi</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	<i>C. albicans</i> : 512 µg/mL <i>T. mentagrophytes</i> : 8 µg/mL <i>T. ajelloi</i> : 32 µg/mL <i>M. gypseum</i> : 16 µg/mL <i>M. cookei</i> : 32 µg/mL <i>M. nanum</i> : 32 µg/mL <i>A. niger</i> : >512 µg/mL <i>A. flavus</i> : >512 µg/mL Padrão (cetoconazol): 128 µg/mL ( <i>C. albicans</i> ); 16 µg/mL ( <i>M. gypseum</i> , <i>M. nanum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. ajelloi</i> ); 8 µg/mL ( <i>M. cookei</i> )	Phuong, T. et al 2004
1h		<i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus niger</i>	<i>C. albicans</i> : 12,5 µg/mL  Padrão (anfotericina B): 1,56 µg/mL Padrão (Clotrimazol): 6,25 µg/mL	Rostom, S.A.F. et al 2014
1i		<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>A. niger</i> : 1,75 µg/mL <i>A. flavus</i> : 1,75 µg/mL <i>F. oxysporum</i> : 2,50 µg/mL Padrão (Bavistina): 25 µg/mL	Suhas, R. 2021

Segundo Bala e colaboradores (2015), a estrutura **1a** apresentada de derivado de tioureia com piperazina demonstrou ser um composto promissor que obteve atividade contra 3 linhagens de fungos, sendo a *C. albicans* com a concentração mínima inibitória maior, podendo ser justificada pela maior resistência adquirida dessa espécie aos fármacos. Para além disto, essa substância foi testada para outros fins como inibição da enzima transcriptase reversa, antitricomonas e espermicida, obtendo bons resultados em todos.

A partir da caracterização e demonstração de atividade antimicrobiana, Mannan (2019) e colaboradores reportaram que a maioria das estruturas, em destaque a **1e** presente na tabela 5 com o núcleo piperazina, apresentaram atividade antifúngica promissora contra *C. albicans* e *C. neoformans*. A atividade em questão pode estar associada aos halogênios ligados aos anéis fenila, bem como em comparação a atividade de compostos de ureia, os derivados de tioureias apresentaram uma atividade melhor, assim sugerindo que o enxofre presente promove uma ligação importante ao farmacóforo.

Ao analisar os resultados obtidos na pesquisa bibliográfica, foi observado que três estudos distintos obtiveram a MIC menor do que o antifúngico utilizado como padrão. Perante a isso, as substâncias apresentam semelhanças estruturais como a presença de anéis fenila com substituições doadoras de elétrons (-OMe) ou receptoras de elétrons (halogênios). Sendo assim compostos promissores e com tendência de menor toxicidade. Estudos desenvolvidos por Keche et al (2019), Rostom et al (2004) e Phuong et al (2004), apresentaram atividade de moderada a fraca para *C. albicans*, enfatizando assim como os demais artigos que substituições nas posições meta e para no anel benzênico, auxiliam no efeito antimicrobiano.

Falagas e colaboradores (2010) em uma revisão sistemática constataram que a *Candida albicans* mantém-se como agente principal de candidemia em regiões geográficas específicas do globo como EUA, regiões ao norte e central da Europa, enquanto espécies não *albicans* eram predominantes na América do Sul, Ásia e sul Europeu (ALDARDEER et al., 2020; FALAGAS; ROUSSOS; VARDAKAS, 2010). Apesar disso, as espécies de *Candida* não-*albicans* tem se manifestado mais resistentes a azóis e equinocandinas. (WHALEY et al., 2017; LEE et al., 2021; MAUBON et al., 2014; PFALLER, 2012; VIEIRA; DO NASCIMENTO, 2017)

As tioureias consistem em uma classe de substâncias com diversas atividades de interesse clínico e potencial terapêutico. Nessa classe é possível observar ligações de hidrogênio pelo átomo de nitrogênio, uma interação habitual entre os fármacos e os sítios de ação importante para atividade biológica (ARANTES, 2009; KECHE; KAMBLE, 2019). Dessa forma esta classe vem demonstrando distintas atividades e se mostrou promissora para ação antifúngica.



## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foram identificados 2 derivados de tioureias contendo núcleo piperazina com atividade antifúngica identificada frente a *C. albicans*. Todas as 14 estruturas testadas foram aprovadas na regra dos 5 de Lipinski, sugerindo uma boa biodisponibilidade oral. Conforme o avaliado pelas regras das indústrias farmacêuticas Lilly, GSK 4/400 e Pfizer 3/75 as substâncias apresentaram um perfil satisfatório, levando em consideração o perfil ADMETox, *druglikeness*, *drug-score*, propriedades físico-química, a ausência de PAINS nestes compostos.

De forma geral, as estruturas **labTIF146** e **labTIF164** se mostraram promissoras, considerando o resultado qualitativo da atividade antifúngica frente a *Candida albicans* em disco difusão em ágar, o perfil farmacocinético e toxicológico favoráveis de modo que se tornam boas candidatas a fármacos antifúngicos. Como perspectiva têm-se a realização do teste de microdiluição em caldo, a fim de quantificar o perfil de atividade das substâncias, além da veiculação de substâncias que apresentarem boa atividade antifúngica em formulações transdérmicas, o que pode vir a gerar novos produtos farmacêuticos antifúngicos com diferentes alvos e formulações em relação aos atualmente disponíveis.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S. Y ; EL-SHARIEF, A.M.S ; BASYOUNI, W.M ; FAKHR, I.M.M.I. Thiourea derivatives incorporating a hippuric acid moiety: Synthesis and evaluation of antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 111–120, jun. 2013.

ALDARDEER, N. F. et al. Antifungal resistance in patients with Candidaemia: A retrospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 17 jan. 2020.

ALQAHTANI, S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1147–1158, 2 nov. 2017.

AMORIM I,P,S; PESTANA, E.R, MENDES, S.JF; Predição do metabolismo do candidato a fármaco cinamaldeído: Uma abordagem *in silico*. **Rev. Ceuma perspectiva** v. 30, n. 1 2017.

ANKER, J.V.D., REED, M.D., ALLEGAERT, K., KEARNS, G.L. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **The Journal of Clinical Pharmacology**. V. 58, N. S10, p. S10–S25. 2018.

ANTYPENKO, L., MEYER, F., KHOLODNIAK, O., SADYKOVA, Z., JIRÁSKOVÁ, T., TROIANOVA, A. STEFFENS, K. G. Novel acyl thiourea derivatives: Synthesis, antifungal activity, gene toxicity, drug-like and molecular docking screening. **Archiv Der Pharmazie**, p 352 n.2, 2018.

ARANTES, F. C. C. Síntese, caracterização e investigação da atividade biológica de complexos de cobre e paládio contendo ligantes N,S doadores. Araraquara, [s.n], 2009.

ASCIOGLU, S. REX, J.H; PAUW, B; BENNET, J.E., ET AL. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. **Definitions of Invasive Fungal Infections • CID**, v. 34, n. 7, p. 7–14, 2002.

ASHLEY, E. S. D.; LEWIS, R.; LEWIS, J. S.; MARTIN, C.; ANDES, D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clin Infect Dis**, v. 43, suppl. 1, p. S28-S39, 2006

BAELL J.B., HOLLOWAY G.A.: Novos filtros de subestrutura para remoção de compostos de interferência de ensaio de tanque (PAINS) de bibliotecas de triagem e para sua exclusão em bioensaios. **J Med Chem** 53: 2719–2740, 2010.

BALA, V; MANDALAU, D., GUPTA, S., ET AL. N-Alkyl/aryl-4-(3-substituted-3-phenylpropyl)piperazine-1-carbothioamide as dual-action vaginal microbicides with reverse transcriptase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 640–650, 25 jul. 2015.

BALAKRISHNAN, N., RAJ, J.S., KANDAKATLA, N. In silico studies on new indazole derivatives as GSK-3 $\beta$  inhibitors. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. V. 5, n.3, p. 295-299. 2015.

BAPTISTA, K. C., NASCIMENTO, K.F., SOUZA, S. J. P., BURCI, L. M., SILVA, F.B. INFECÇÕES HOSPITALARES POR *Candida* sp. EM PACIENTES INTERNADOS EM UTI. **Revista Gestão e Saúde**, v. 2, n. 22, 2020.

BENEDICT, K; JACKSON, B. R.; CHILLER, T. KARLYN, D.B. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 2019.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5 n. 2, p. 159–172, 2004.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–19, 1 jun. 2020.

BHOWRUTH, V., BROWN, A.K. REYNOLDS, R.C., COXON, G.D., MACKAY, S.P., MINNIKIN, D.E., BERSA, G.S. Symmetrical and unsymmetrical analogues of isoxyl; active agents against *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 18, p. 4743–4747, 15 set. 2006.

BIELENICA, A. STEFAŃSKA, J., K. STĘPIEŃ, K, ET AL. Synthesis, cytotoxicity and antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 111–125, 26 jun. 2015.

BONGOMIN, F, GAGO, S., OLADELE, R. O. DENNING, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 1 dez. 2017.

BORBA, H. H. L. STEIMBSCH, L. M., RIVEROS, B.S., ET AL. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 754–763, 1 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Renome. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria GM/MS nº 420, de 2 de março de 2022. Altera o Anexo 1 do Anexo V à Portaria de Consolidação GM/MS nº 4, de 28 de setembro de 2017, para incluir a síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional.

BROWN, G. D. DENNING, D.W., GOW, N.A.R., LEVITZ, S.M., NETEA, M.G., WHITE, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 19 dez. 2012.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. 2012.

CABALLERO, J., FERNÁNDEZ, M. Linear and nonlinear modeling of antifungal activity of some heterocyclic ring derivatives using multiple linear regression and Bayesian-regularized neural networks. **J Mol Model**. V. 12, n. 2, p. 168-181. 2006.

C-A CHEN, S.; SLAVIN, M. A.; SORRELL, T. C. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections A Comparison. **Drugs**, v. 71, n.1, p. 11-41. 2011.

CHANDRASEKHAR, M, PRASAD, G. S., VENKATARAMAIAH, C., RAJU, C. N., SESHIAH, K., RAJENDRA, W. synthesis, spectral characterization, docking studies and biological activity of urea, thiourea, sulfonamide and carbamate derivatives of imatinib intermediate. **Molecular Diversity**, v. 23, n. 3, p. 723–738, 2019.

CDC. **CDC and Fungal Diseases**. Fact sheet Drug-resistant *Candida auris*.2019 Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/candida-auris-508.pdf> Acesso em 19 de setembro de 2022.

CDC. **CDC and Fungal Diseases**. Invasive candidiasis. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/index.html> Acesso em 19 de setembro de 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2; 2010a.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, 2015.

CUI, J. et al. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362–371, 1 jan. 2015.

DUCHOWICZ, P.R., VITALE, M.G., CASTRO, E.A., FERNÁNDEZ, M., CABALLERO, J. QSAR analysis for heterocyclic antifungals. **Bioorg. Med. Chem**, v. 15,[s.n.], p. 2680-2689, 2007.

DUTCHER, J.D. The discovery and development of amphotericin B. **Dis Chest**.V.54, p.296-298, 1968

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, [s.n.], p. 954-966. 2010.

FILIPPIN, F.B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 167-192, 2006.

FOTHERGILL, A.W; SUTTON, D.A; MCCARTHY, D.I; WIEDERHOLD, N.P; Impact of New Antifungal Breakpoints on Antifungal Resistance in Candida Species. **Journal of Clinical Microbiology** V. 52 N. 3, p. 994 –997. 2014.

**GAFFI**. GLOBAL ACTION FUND FOR FUNGAL INFECTIONS. Introduction. Disponível em: < <http://www.gaffi.org/>>.

GALOCHA, M. et al. Genomic evolution towards azole resistance in Candida glabrata clinical isolates unveils the importance of CgHxt4/6/7 in azole accumulation. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1118, 21 out. 2022.

GETTYS, K. E., YE, Z., DAI, M. Recent Advances in Piperazine Synthesis. **Synthesis**, v. 49, [s.n], p. 2589-2604. 2017

GHORAB, M. M., ALSAID, M. S., EL-GABY, M.S.A., ELAASSER, M.M., NISSAN, Y. M. Antimicrobial and anticancer activity of some novel fluorinated thiourea derivatives carrying sulfonamide moieties: Synthesis, biological evaluation and molecular docking. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p.11-32. 2017.

GIACOMAZZI, J., BAETHGEN, L., CARNEIRO, L.C, MILLINGTON, M.A, DENNING, D.W, COLOMBO, AL, PASQUALOTTO, A.C - O fardo de infecções fúngicas humanas graves no Brasil. **Mycoses**, v. 59, [s.n], p. 145-150, 2016.

GLEESON, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. **J. Med. Chem.**, v.51, p.817–834, 2008.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Designing Irreversible Inhibitors- worth the effort? **Chem med chem**, v. 11, n. 1, p. 22-30. 2016.

GURGUÍ, M., CUENCA-ESTRELLA, M. Situación actual de las infecciones fúngicas invasivas. Las nuevas técnicas diagnósticas y los nuevos antifúngicos. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin**; n. 26, Supl. 14:1-6, 2008.

HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p.106-122. 2020.

HUGHES J. D., BLAGG J., PRICE D. A., BAILEY S., DECRESCENZO G. A., DEVRAJ R. V., ET AL. Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.18, p.4872–4875, 2008

KATLA V.R., SYED R., GOLLA M., SHAIK A., CHAMARTHI N.R. Synthesis and biological evaluation of novel urea and thiourea derivatives of valaciclovir. **J. Serb. Chem. Soc.** 79:283–289; 2014.

KATZUNG, B.G; MASTERS, S.B; TREVOR, A.J. Pharmacology Examination e board review. 12ed. Lange Medical books, p.420, 2014.

KECHE, A. P.; KAMBLE, V. M. Synthesis and anti-inflammatory and antimicrobial activities of some novel 2-methylquinazolin-4(3H)-one derivatives bearing urea, thiourea and sulphonamide functionalities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1522–1531, 1 nov. 2019.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.

LEE, H.; LEE, D. G. Novel approaches for efficient antifungal drug action. Journal of Microbiology and Biotechnology. **Korean Society for Microbiology and Biotechnology** v. 28, n. 11, 2018.

LEE, Y., PUUMALA, E., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411. 2021.

LEWIS, R. E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology; PharmD - **Journal List - Mayo Clin. Proc.** v.86, n.8, p. 805-817, 2011.

LIFE. **Leading International Fungal Education**. Fungal infections. Disponível em: <https://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/invasive/>. Acesso em 17 de novembro de 2022.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug. Deliv.** V.42, p.3–22, 2001.

MAGOULAS, G. E., KALOPETRIDOU, L., CIRIC, A. et al. Synthesis, biological evaluation and QSAR studies of new thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives as antimicrobial and antifungal agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 106, 2021.

MALTAROLLO, V. G., GERTRUDES, J.C. OLIVEIRA, P.R., HONORIO, K.M. Applying machine learning techniques for ADME-Tox prediction: A review. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 259–271, 2015.

MANNAM, M. R., DEVINENI, S. R., PAVULURI, C. M., CHAMARTHI, N. R., & KOTTAPALLI, R. S. P. Urea and thiourea derivatives of 3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1, 2, 4]triazolo[4,3-a]pyrazine: Synthesis, characterization, antimicrobial activity and docking studies. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, V. 194, N.9, P. 922–932. 2019.

MAUBON, D., GARNAUD, C., CALANDRA, T., SANGLARD, D., CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive Care Medicine**. 2014.

MANSUROĞLU, D. S. et al. Synthesis and characterization of N-(2,2-Diphenylacetyl)-N'-substituted thiourea derivatives: The crystal structure of N-(2,2-Diphenylacetyl)-N'-(4-chloro phenyl)-thiourea. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, v. 184, n. 12, p. 3221–3230, 2009.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 369–383, 2008.

MCCARTHY, M. W. & WALSH, T. J. Drug development challenges and strategies to address emerging and resistant fungal pathogens. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v.15, n. 6, p. 577–584, 2017.

MODA, T.L. Modelagem *in silico* de propriedades farmacocinéticas par avaliação de candidatos a novos fármacos. **Tese de pós-graduação USP São Carlos**. 2011.

MOHAMED, N. A.; ABD EL-GHANY, N. A. Preparation and antimicrobial activity of some carboxymethyl chitosan acyl thiourea derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1280–1285. 2012.

NEGRI, M., SALCI, T.P., MESQUITA, S.S., CAPOCI, I.R.G., SVIDZINSKI, T.I.E., KIOSHIMA, E.S. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925–2956, 2014.

NICHELE, S.; ZIMMERMANN, E. S.; BRUCKER, N. Monitoramento terapêutico de voriconazol no manejo de infecções fúngicas invasivas. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria**. v. 20, n. 2, p. 581–590, 2019.

NICOLA, A. M.; ALBUQUERQUE, P.; PAES, H. C.; FERNANDES, L.; COSTA, F. F.; KIOSHIMA, E. S.; ABADIO, A. K. R.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S. Antifungal Drugs: New Insights in Research & Development. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 195, p. 21-38, 2018.

NIGAM, P.K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. **Our Dermatology Online**, v. 6, n. 2, p. 212–221. 2015.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1. 2012.

PHUONG, T. et al. Synthesis and antifungal activities of phenylenedithioureas. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 3, p. 653–656. 2004.

REVIE NM, IYER KR, ROBBINS N, COWEN LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol**. V.45 P.70-76, 2018.

RICOTTA, E. E. LAI, Y.L., BABIKER, A., STRICH, J., KADRI, S.S., LIONAKIS, M.S., PREVOTS, D.R., ADJEMIAN, J. Invasive Candidiasis Species Distribution and Trends, United States, 2009-2017. **Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 7, p. 1295–1302, 1 abr. 2021.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 753–75, 2017.

RODRIGUES, M. L. Negligenciadas entre as negligenciadas: perspectiva de prevenção, controle e diagnóstico de doenças causadas por fungos. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2019.

RODRÍGUEZ, F. E., MANZANO, J. L., BENITO, J. J., HERMOSA, R., MONTE, E., CRIADO, J. J. Thiourea, triazole and thiadiazine compounds and their metal complexes as antifungal agents., **J. Inorg. Biochem.** V.99, n.8, p.1558-72, 2005.

ROSTOM, S. A. F. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some indeno1,2-pyrazol(in)es substituted with sulfonamide, sulfonylurea(-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. **Bioorg. Med. Chem.**; v. 14; n. 19; p. 6475-6485. 2006.

SAEED, A.; FLÖRKE, U.; ERBEN, M. F. A review on the chemistry, coordination, structure and biological properties of 1-(acyl/aroyl)-3-(substituted) thioureas. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 318–355, 2013.

SAEED, A., SHAHEEN, U., HAMEED, A. NAQVI, H. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some new 1-(fluorobenzoyl)-3-(fluorophenyl)thioureas. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 130, n. 11, p. 1028–1034, 2010.

SALCI, T. P. et al. **Targeting Candida spp. to develop antifungal agents. Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2018.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de Candida albicans. **Rev Cienc Med Biol**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

SENEVIRATNE, C. J.; ROSA, E. A. R. Editorial: Antifungal drug discovery: New theories and new therapies. **Frontiers in Microbiology**.V. 7, N. 728, 2016.

SHAFIEI, M. PEYTON, L., HASHEMZADEH, M., FOROUMADI, A. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104240. 2020.

SOMCHIT, N., NORSHAHIDA, A.R., HASIAH, A.H., ZURAINI, A., SULAIMAN, M.R., NOORDIN, M.M. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: A comparative in vivo study. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, n. 11, p. 519–525. 2004.

SUHAS, R.; CHANDRASHEKAR, S.; GOWDA, D. C. Synthesis of uriedo and thiouriedo derivatives of peptide conjugated heterocycles - A new class of promising antimicrobials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 179–191. 2012.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; JURCA, B. C.; ILIES, M. A., Carbonic anhydrase inhibitors - Part 49: Synthesis of substituted ureido and thioureido derivatives of aromatic/heterocyclic sulfonamides with increased affinities for isozyme I **Eur. J. Med. Chem.**, V 33, n83. 1998



TAYLOR, R.D., MACCOSS, M., LAWSON, A.D.G. Rings In Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 57, [s.n], p 5845-5859. 2014.

TESCHKE, R. Idiosyncratic DILI: Analysis of 46,266 Cases Assessed for Causality by RUCAM and Published From 2014 to Early 2019. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, N. 730. 2019.

TOBUDIC, S. et al. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 271–274, 2009.

VALERIO, L.G. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 241, n. 3, p. 356-370. 2009.

VAN DAELE, R., SPRIET, I., WAUTERS, J. MAERTENS, J., MERCIER, T. BRÜGGEMANN, R et al. Antifungal drugs: What brings the future? **Medical Mycology**. Oxford University Press. V. 57, N. S3, 2019.

VARANO, N., LIMA, M.F.M., CARDOSO, I.R. ET AL. Infecções por *Candida* spp em pacientes imunodeprimidos. **Journal of Infection Control**. V. 8, N.1. P. 17-23, 2019.

VIANA, F.A.C. Estudo comparativo, randomizado para avaliar a eficácia terapêutica da piperazina hexahidratada com extrato fluido de *rhamnus purshiana* no tratamento da ascaridíase. Universidade Federal do Ceará. 2007.

VEKARIYA, M. K., PATEL, D.B., PANDYA, P.A., VEKARIYA, R.H., SHAH, P.U., RAJANI, D.P., SHAH, N.K. Novel N-thioamide analogues of pyrazolopyrimidine based piperazine: Design, synthesis, characterization, in-silico molecular docking study and biological evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1175, p. 551–565, 5 jan. 2019.

VINCENT, J.L., RELLO, J., MARSHALL, J. ET AL. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **Jama**, v. 302, n. 21, p. 2323- 2329. 2009.

VIEIRA, F.; DO NASCIMENTO, T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica. **Rev Port Farmacoter**. V. 9 [s.n.], p. 161-168. 2017.

WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. **Antibiotics**. V. 9, n. 445, 2020.

WATERBEEMD, H.V., GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**. V. 2, [s.n.], p. 192—204. 2003.

WHALEY, S. G., BERKOW, E.L., RYBAK, J. M., NISHIMOTO, A.T., BARKER, K.S., ROGERS, D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**. V. 7, n. 2173, 2017.

WOUTERS, O.J., MCKEE M., LUYTEN J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**. 2020; 323(9):844-853.

YU, H.; ADEDOYIN, A. ADME–Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. **Drug discovery Today**, v. 8, n. 18, 2003.

ZAMBRANA, J. T., ZAMBRANA, F. F.T., NETO, F.R.S GONÇALVES, A. L. C., ZAMBRANA, F.F.T. USHIROHIRA, J. Agranulocytosis with tonsillitis associated with methimazole therapy. **RevBras Otorrinolaringologia**, 2015.