

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SÍNTESE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NOVOS DERIVADOS DE 5-SULFONAMIDA-8-HIDROXIQUINOLINA  
SUBSTITUÍDOS

Mariana Pies Gionbelli

Porto Alegre, 2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**SÍNTESE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NOVOS DERIVADOS DE 5-SULFONAMIDA-8-HIDROXIQUINOLINA  
SUBSTITUÍDOS**

Dissertação apresentada por **Mariana  
Pies Gionbelli** para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Porto Alegre, 2022

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26/06/2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Eduardo Luis Konrath  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Francisco Paulo dos Santos  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Walter Orlando Beys da Silva  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Gionbelli, Mariana  
SÍNTESE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE NOVOS DERIVADOS DE 5-SULFONAMIDA-8-HIDROXIQUINOLINA  
SUBSTITUÍDOS / Mariana Gionbelli. -- 2022.  
69 f.  
Orientador: Saulo Fernandes de Andrade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2022.

1. Síntese de novas moléculas. 2. Atividade  
antifúngica. I. Fernandes de Andrade, Saulo, orient.  
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Ao meu noivo Mathias Martens por ter estado ao meu lado nos momentos mais difíceis e felizes e ter demonstrado grande apoio durante toda esta trajetória.

Aos meus pais, Cecília Pies Gionbelli e Valdir Gionbelli, pelo amor infinito e que mesmo distantes sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos, sendo meu maior incentivo.

Aos meus irmãos, Cristian Pies Gionbelli (em memória) e Heléia Bortolosso (em memória), pelo grande exemplo de vida e superação, e Mateus Pies Gionbelli, pelo grande apoio sempre.

Aos meus sobrinhos, Antônio Ramalho Gionbelli e Jhordana Bortolosso, e meus afilhados, João Pedro Ramalho Gionbelli e Lorenza Bortolosso, por tornarem meu caminho até aqui mais leve e alegre.

Aos meus avós, em especial à minha avó Elce Testa Gionbelli (em memória) e meu avô Domingos Gionbelli, pelo exemplo de amor e fé.

Ao meu orientador Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade por me acompanhar e orientar em mais uma etapa da minha carreira profissional e pelo apoio e compreensão quanto às minhas decisões.

À minha amiga e colega de laboratório Angélica Rocha Joaquim, pela parceria e disponibilidade em diversas situações.

Às minhas amigas Gabriele Horn Toffolo e Tainara Benin por me acompanharem e apoiarem durante todos estes anos.



## RESUMO

O gênero *Cryptococcus* caracteriza-se por um fungo leveduriforme que é causador da criptococose, uma infecção sistêmica que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. As formas mais graves dessa doença são a forma pneumonia e a meningite criptocócica, que quando não tratada é fatal. A criptococose causa anualmente cerca de 181 mil mortes, representando cerca de 65% dos casos totais diagnosticados da doença. O tratamento atual da criptococose é realizado com anfotericina B, fluconazol e flucitosina, que representam três fases distintas do tratamento, cada uma com duração variando de 2 semanas a 2 anos. É um tratamento complexo, demorado, e que apresenta alta toxicidade e altos custos medicamentosos e de hospitalização. Além disso, o desenvolvimento de resistência às opções de tratamento disponíveis tem alavancado nos últimos anos, sendo uma ameaça global à saúde. Derivados de 8-hidroxiquinolina (8HQ) têm apresentado efeitos biológicos interessantes. Novos derivados sulfonamida de 8HQ foram identificados por nosso grupo de pesquisa como bons candidatos à antimicrobianos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi a síntese química de novos derivados sulfonamida de 8HQ, para estudar a importância do substituinte da sulfonamida na posição 5 da 8HQ. Neste presente estudo foram obtidos 15 novos derivados com rendimentos moderados. Foi possível identificar 4 derivados de 8HQ-5-sulfonamida que apresentaram boa atividade anti-*Cryptococcus*, com CIMs variando entre 2 e 8 µg/mL e que também foram capazes de alterar a morfologia da cápsula fúngica do *Cryptococcus neoformans*.

Palavras chave: Derivados de 8-hidroxiquinolina, criptococose, atividade antifúngica, síntese, sulfonamidas.





## ABSTRACT

Title: Synthesis and evaluation of the antimicrobial activity of new substituted 5-sulfonamide-8-hydroxyquinoline derivatives

The genus *Cryptococcus* is characterized by a yeast-like fungus that causes cryptococcosis, a systemic infection that mainly affects immunocompromised individuals. The most serious form of this disease is cryptococcal meningitis, which is fatal if left untreated. Cryptococcosis causes about 181,000 deaths annually, representing about 65% of the global diagnosed cases of the disease. Current treatment of cryptococcosis is performed with amphotericin B, fluconazole and flucytosine, which represent three distinct phases of treatment, each lasting from 2 weeks to 2 years. It is a complex, time-consuming treatment, that presents high toxicity and high drug and hospitalization costs. In addition, the development of resistance to available treatment options has escalated in recent years, being a global health threat. 8-hydroxyquinoline derivatives (8HQ) have shown interesting biological effects. New sulfonamide derivatives of 8HQ were identified by our research group as good antimicrobial candidates. Therefore, the aim of this study was the chemical synthesis of new sulfonamide derivatives of 8HQ, to study the importance of the sulfonamide substituent at position 5 of 8HQ. In the present study, 15 new derivatives were obtained with moderate yields. It was possible to identify 4 8HQ-5-sulfonamide derivatives that showed good anti-*Cryptococcus* activity, with MICs ranging between 2 and 8 µg/mL, and that were also able to change the morphology of the fungal capsule of the *Cryptococcus neoformans* cells.

Key words: 8-Hydroxyquinoline derivatives, cryptococcosis, antifungal activity, synthesis, sulfonamides.



## SUMÁRIO

<b>1.1. Aspectos gerais</b> .....	11
<b>1.2. Revisão bibliográfica</b> .....	14
<b>1.2.1. Dados epidemiológicos</b> .....	14
<b>1.2.2. Patologia e patógeno</b> .....	17
<b>1.2.3. Fatores de virulência</b> .....	18
<b>1.2.3.1. Cápsula fúngica e parede celular</b> .....	19
<b>1.2.3.2. Melanina</b> .....	21
<b>1.2.3.3. Termotolerância</b> .....	21
<b>1.2.4. Tratamento</b> .....	22
<b>1.2.4.1. Resistência e limitações</b> .....	25
<b>1.2.5. Novos compostos</b> .....	26
<b>3. Discussão geral</b> .....	49
<b>3.1. Mecanismo de ação</b> .....	49
<b>3.2. Elucidação estrutural do derivado</b> .....	50
<b>4. Conclusão e perspectiva</b> .....	59
<b>5. Referências</b> .....	61



## 1. Introdução

### 1.1. Aspectos gerais

As doenças infecciosas têm se tornado cada vez mais uma ameaça à saúde global. Há décadas as infecções são uma das principais causas de morte no mundo, sendo as infecções invasivas as mais graves. Apesar de terem apresentado uma redução no número de mortes nos últimos anos, as infecções do trato respiratório inferior ainda ocupam o quarto lugar dentre as dez maiores causas de mortes no mundo desde 2000 e são consideradas as doenças transmissíveis mais mortais. Nos países de baixa renda a situação é mais alarmante, onde infecções do trato respiratório inferior são a segunda maior causa de mortalidade, ainda seguida de outras infecções transmissíveis entre as dez maiores causas de morte [1]. A falta de acessibilidade ao tratamento com antimicrobianos é a principal causa deste índice aumentado em alguns países, caracterizando a importância do fator socioeconômico no combate às infecções. Dentre as principais infecções que representam uma ameaça à saúde estão as infecções fúngicas, que costumam apresentar dificuldades no tratamento devido ao longo período de utilização e toxicidade dos fármacos. Além disso, com exceção dos fungos dermatófitos, infecções fúngicas não ocorrem com frequência em indivíduos imunocompetentes, fazendo com que elas sejam frequentemente negligenciadas. As infecções fúngicas de mais difícil manejo atualmente são as micoses sistêmicas: doenças invasivas que acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, causando cerca de 1,5 milhões de mortes ao ano, quantidade de mortes similar à causada pela tuberculose e três vezes maior do que a causada pela malária [67].

Uma importante micose que pode se tornar invasiva atualmente é a criptococose, uma micose que, apesar de estar associada a um prognóstico ruim em pacientes imunocomprometidos, até a década de 1970 não era considerada clinicamente relevante [3]. Porém, com o aumento de doenças imunossupressoras, infecções causadas pelo gênero *Cryptococcus* tornaram-se mundialmente importantes, destacando-se principalmente durante o auge da transmissão de HIV no início dos anos 2000, quando

foram relatados mais de 1 milhão de casos de criptococose por ano e, destes, cerca de 600 mil resultaram em morte [3]. A expansão da distribuição do coquetel de medicamentos para terapia antirretroviral foi capaz de reduzir consideravelmente o número de casos da doença ao mesmo tempo que os avanços na medicina aumentaram o número de indivíduos imunocomprometidos suscetíveis à infecção pelo gênero *Cryptococcus* [3].

A forma atual mais grave de criptococose e também responsável pelo maior número de mortes causadas pela doença é a meningite criptocócica [3]. Além disso, a criptococose também ocorre com menor frequência como uma micose cutânea em humanos, além de acometer também outros mamíferos domésticos como cães e gatos, e também animais silvestres [56]. Os complexos de espécies mais frequentemente associados com a criptococose são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, sendo o complexo *C. neoformans* responsável por mais de 90% dos casos de criptococose em pacientes imunossuprimidos [57], enquanto *C. gattii* é o principal causador da infecção em imunocompetentes, totalizando cerca de 10% dos casos totais de criptococose no mundo ou até 15% quando se trata de regiões tropicais [58,59]. Em contrapartida, pacientes imunocompetentes frequentemente apresentam-se assintomáticos, retardando o diagnóstico da doença e aumentando as chances de tratamentos mais complexos, mesmo para estes casos mais simples da doença [66].

São listados três grandes grupos de risco acometidos pela criptococose, são eles: pacientes portadores de HIV, pacientes transplantados e imunocompetentes. Como já citado anteriormente, os casos em pacientes soropositivos são mais comuns, porém o perfil da doença tem apresentado alterações na última década dependendo do grupo atingindo, sendo possível observar maiores atrasos no diagnóstico de pacientes imunocompetentes juntamente com maior taxa de mortalidade neste grupo quando acometidos de meningite criptocócica. Sendo assim, mesmo com o aumento da disponibilidade de terapia antirretroviral e surgimento de apresentações farmacêuticas melhoradas no tratamento da criptococose, como a forma lipossomal da anfotericina B, a frequência da infecção não se alterou nas últimas duas décadas e a ocorrência entre os

três grupos acometidos sofreu variações [15,16,17]. É um tratamento complexo, bastante longo - podendo levar até dois anos, de alta toxicidade e altos custos medicamentosos e de hospitalização. Além disso, o desenvolvimento de resistência às opções de tratamento disponíveis atualmente tem alavancado nos últimos anos, sendo reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como uma ameaça global à saúde e ao desenvolvimento e que requer ações urgentes [61].

O tratamento atual da criptococose é realizado majoritariamente com anfotericina B, fluconazol e flucitosina [24]. Os três fármacos apresentam mecanismos de ação distintos. A flucitosina, por atuar como análogo de citosina, apresenta altas taxas de desenvolvimento de resistência e não deve ser administrada como monoterapia. O fluconazol inibe a síntese de ergosterol e os relatos de resistência de *Cryptococcus* spp. têm aumentado gradativamente nas últimas décadas. Por fim, a anfotericina B liga-se diretamente ao ergosterol é potencialmente tóxica às células mamíferas por interagir em menor proporção com o colesterol. Outro fator relevante é o tamanho molecular da anfotericina B, que dificulta seu metabolismo. O desenvolvimento de pequenas moléculas capazes de atuar em mecanismos exclusivos do fungo, se torna claro e urgente.

Derivados de 8-hidroxiquinolina (8HQ) ou 8-quinolinol têm apresentado efeitos biológicos interessantes como atividade antifúngica, antibacteriana e antiparasitária e até mesmo estresse oxidativo contra a doença de Alzheimer tem sido relatado [94]. Nosso grupo de pesquisa tem buscado encontrar novos derivados de 8HQ com atividade antifúngica, o que nos levou à descoberta de novos derivados de 8-hidroxiquinolina 5,7-substituídos com ótima atividade anti-*Candida* [34, 35].

Compostos como o ácido 8-hidroxi-5-quinolinosulfônico, 8-hidroxiquinolina-5-sulfonamida e 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida revelaram ser candidatos antifúngicos promissores por apresentarem valores de CIM mais baixos que os medicamentos de referência contra as cepas testadas. Dos derivados de 8-hidroxiquinolina-5-sulfonamida, observou-se melhor atividade antifúngica quando o

substituinte ligado à sulfonamida era um anel aromático ou um heterociclo insaturado [34,35]. Além disso, alguns trabalhos também relatam atividade anti-*Cryptococcus* interessante de derivados de 2-amino-4-feniltiazol [46,47,106].

Dito isso, o objetivo deste estudo foi a síntese de novos derivados sulfonamida de 8HQ, com foco em substituintes heterocíclicos insaturados, para estudar a importância do substituinte da sulfonamida na posição 5 de 8HQ. Além disso, é proposto um híbrido de feniltiazol com 5-sulfonamida-8-hidroxiquinolina, visando uma melhor interação com o receptor e, conseqüentemente, uma melhora na atividade desses derivados.

## **1.2. Revisão bibliográfica**

### **1.2.1. Dados epidemiológicos**

A criptococose é uma infecção predominantemente oportunista, que se apresenta principalmente na forma sistêmica. Sua forma mais comum é a meningite criptocócica e ocorre com maior frequência em indivíduos que apresentam o sistema imunológico comprometido, como na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou em pacientes que apresentam alguma outra forma de depleção da produção de leucócitos, podendo essa ser causada primariamente por alguma doença ou por terapia medicamentosa com imunossupressores e citostáticos [7]. Sua forma cutânea ocorre em cerca de 10 a 15% dos indivíduos com a doença na forma sistêmica, sendo a inoculação traumática primária na pele uma forma mais rara de infecção [8].

Dentre os dados epidemiológicos globais sobre infecções fúngicas que acometem o SNC, a meningoencefalite criptocócica é a infecção mais comum, sendo mais comum em regiões com acesso médico dificultado e infecções não controladas por HIV [9]. A deficiência na imunidade celular, especialmente quando mediada por linfócitos CD4+, é o principal fator negativo para a progressão da doença, seguido de imunossupressão associada ao transplante de órgãos e administração continuada de corticosteróides e por fim a presença de outras doenças malignas, sarcoidose e também insuficiência hepática e renal [4,6,14]. Após a implementação da terapia antirretroviral (ARV) houve uma



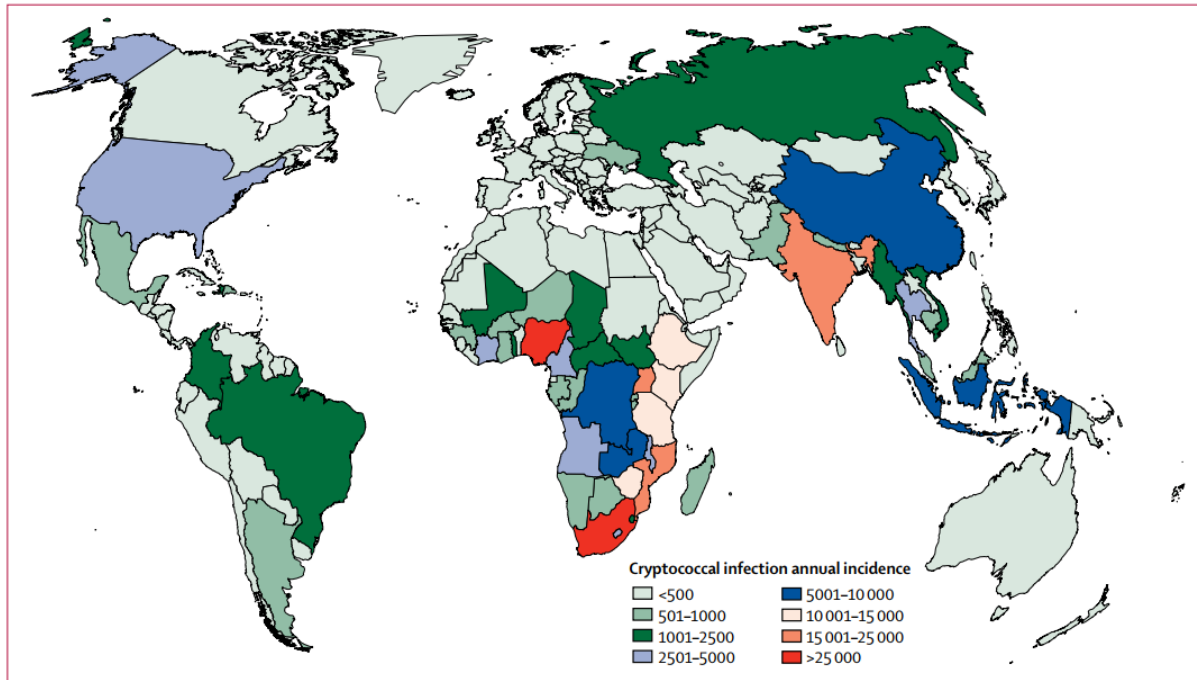
mudança favorável nos casos de criptococose associados à portadores de HIV. No entanto, o diagnóstico tardio, a dificuldade de acesso à ARV e até mesmo a falha deste tratamento resultam em falha no cuidado ao paciente com HIV e no desenvolvimento de meningite criptocócica. Ao mesmo tempo que a redução dos casos em pacientes corretamente tratados com ARV é observada, ainda que apenas em países com acesso a essa terapia, nota-se um aumento na incidência da doença em outras situações imunossupressoras, como os indivíduos transplantados [15, 16].

A meningite criptocócica representa aproximadamente 80% dos casos totais de morte por criptococose, sendo a principal causa de meningite em adultos portadores de HIV no mundo e apresentando taxa de mortalidade de 100% caso a infecção não seja tratada. Por acometer principalmente indivíduos aids, a meningite criptocócica é também considerada um indicador de sucesso ou falha do programa de tratamento do HIV [3].

Estima-se que a quantidade total de casos de meningite criptocócica no mundo anualmente seja cerca de 223100, já que em 2014 foram registradas 181100 mortes. Sendo assim, a meningite criptocócica é responsável por aproximadamente 15% das mortes associadas à SIDA, fazendo com que a criptococose seja a segunda maior causa de mortalidade em pacientes aids, sendo a primeira maior causa a tuberculose [3,5]. Em regiões com acesso aos medicamentos antirretrovirais dificultado, como regiões da África subsaariana, os casos de meningite criptocócica ainda são relacionados à altos índices de mortalidade, representando 73% dos casos mundiais. O segundo maior número de casos de meningite criptocócica ocorre na região da Ásia-Pacífico, com 19% de casos (Figura 1) [3,7,9].

A criptococose é atualmente um grande problema de saúde pública, inclusive no Brasil, caracterizado pelo diagnóstico tardio e por apresentar altas taxas de mortalidade. Um estudo publicado em 2019 apresentou o perfil epidemiológico da criptococose no Brasil entre 2000 e 2012, onde foram registradas 5755 mortes que tiveram *Cryptococcus* spp. associado como uma das causas do óbito. 19,5% destes consideraram a criptococose

como causa básica da morte e o restante foi associado a outros fatores de risco para o falecimento, onde a AIDS é o principal destes fatores [4].



**Figura 1.** Prevalência de casos de criptococose no mundo (Rajasingham, 2017).

A espécie *C. neoformans* é a principal causadora de criptococose, sendo responsável por mais de 90% dos casos. A espécie *C. gattii* representa apenas 10% dos casos, ou até 15% quando se trata de regiões tropicais. No entanto, essa fração era quase desprezível até o ano de 1999, quando ocorreu a epidemia de criptococose ocasionada por *C. gattii* [5]. Atualmente, não é possível apontar um nicho específico para *C. neoformans* e *C. gattii*, já que elas podem ser encontradas em todos os continentes e em diversos substratos no meio ambiente, sendo ligeiramente mais comum em locais de clima tropical e subtropical [73]. O principal habitat do *C. neoformans* são excrementos secos de aves, mais comumente pombos, podendo também ser encontrado no solo, em fragmentos de vegetação e poeira doméstica. Além disso, infecções por *C. neoformans* são mais prevalentes em regiões urbanas de clima temperado e frio [74]. Já o nicho ecológico do *C. gattii* está mais relacionado à vegetação e áreas rurais, sendo muito comum em eucaliptos, e é responsável por infecções em climas tropicais e subtropicais [57,58].

Hoje, são considerados cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* e oito tipos moleculares, que são: VNI e VNII que correspondem a *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A, VNIII que caracteriza híbridos de *C. neoformans* sorotipo AD, VNIV correspondente a *C. neoformans* sorotipo D e VGI, VGII, VGIII e VGIV correspondentes a *C. gattii* sorotipos B e C [73, 75]. Nas infecções por *C. neoformans* o sorotipo A variedade *grubii* é encontrada com maior frequência e nas infecções por *C. gattii* prevalece o sorotipo B [73].

### 1.2.2. Patologia e patógeno

O agente etiológico *Cryptococcus neoformans* é a forma assexuada do basideomiceto *Filobasidiella neoformans*, ambas leveduras encapsuladas. Os fungos deste gênero apresentam cápsula polissacarídica e são considerados patógenos acidentais por não necessitarem do hospedeiro mamífero para completar seu ciclo de vida [5,20]. O *Cryptococcus* spp. é encontrado no ambiente crescendo como levedura haplóide, que se replica assexuadamente por mitose. A forma filamentosa do fungo é resultado da reprodução sexuada e forma filamentos dicarióticos (com núcleos distintos) que podem produzir basidiósporos a partir de meiose [5,14]. Os esporos do fungo apresentam polissacarídeos especiais, ligeiramente diferenciados daqueles presentes nas formas leveduriforme e filamentosa, que proporcionam maior proteção do ambiente ao fungo [23].

*C. neoformans* é o patógeno responsável pela maior parte das infecções causadas por este gênero, causando infecções tanto em imunocomprometidos quanto imunocompetentes, e é, conseqüentemente, a espécie melhor compreendida até o momento. Por outro lado, a maioria das infecções causadas por *C. gattii* ocorre em pacientes aparentemente imunocompetentes. Apesar das duas espécies acometerem indivíduos imunocompetentes, a quantidade destes que apresentam infecções por *C. gattii* é consideravelmente maior. Além disso, o perfil da doença pode se apresentar diferente dependendo da espécie de *Cryptococcus*. Enquanto infecções por *C.*

*neoformans* costumam evoluir para quadros de disseminação para o SNC a partir da infecção pulmonar, as infecções por *C. gattii* apresentam-se mais frequentemente como abscessos focais no cérebro e no pulmão. Sugerindo que o *C. gattii* possua características de virulência com tendência a promover infecções localizadas nos tecidos, sem disseminação sistêmica [18,19].

A resposta imune ao *Cryptococcus* spp. é mediada por macrófagos e células dendríticas, que atuam no reconhecimento, apresentação de antígeno e ativação da resposta imune no hospedeiro para fagocitose. Além da morte intracelular e extracelular do patógeno mediada por células, também pode ocorrer a formação de granuloma através do sequestro da levedura no tecido por macrófagos, caracterizando a presença de abscessos focais. E estes ocorrem com maior frequência em infecções por *C. gattii*, porque a espécie apresenta uma taxa de proliferação intracelular em macrófagos maior do que o *C. neoformans* [11, 88].

O processo de infecção pelo *Cryptococcus* spp. no organismo do hospedeiro inicia no pulmão (exceto quando a infecção é cutânea), levando inicialmente ao desenvolvimento da primoinfecção localizada no pulmão e dependendo da capacidade de resposta imune do hospedeiro, assim como da virulência da cepa infectante, o microrganismo pode seguir para disseminação hematogênica e atingir o SNC e outros órgãos. A infecção primária no pulmão é muitas vezes assintomática e em pacientes imunocompetentes pode regredir espontaneamente. Sendo assim, o mecanismo mais significativo do gênero *Cryptococcus* na doença é a sua disseminação do pulmão para a corrente sanguínea e posteriormente para o SNC, o qual depende de permeação por diversas barreiras e leva às formas mais graves da doença, como a meningite criptocócica [14].

### **1.2.3. Fatores de virulência**

Novas rotas metabólicas e alvos antifúngicos estão sendo estudados para identificar prováveis novos compostos antifúngicos, através de mecanismos de ação ainda não

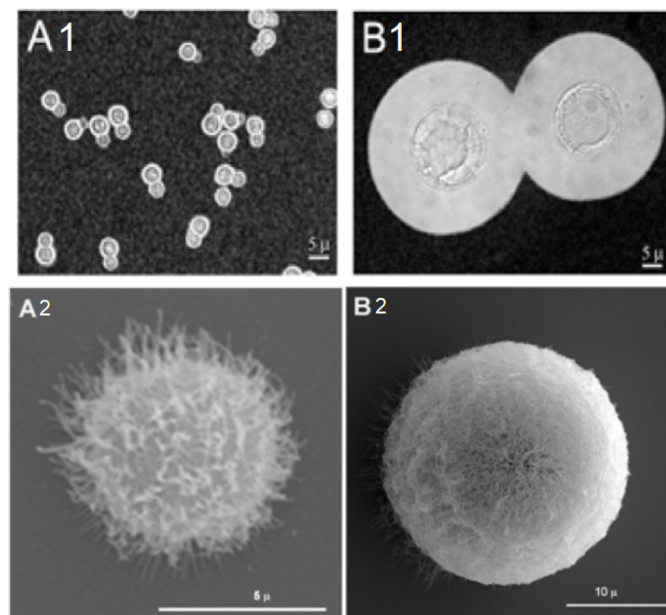
utilizados. Além de sugerir novas estruturas com atividade antifúngica, analisar os mecanismos de virulência do microrganismo também pode direcionar para a descoberta de estratégias não medicamentosas que podem potencializar o tratamento [66].

Por se tratar de um fungo ambiental que causa infecção oportunista em humanos, o gênero *Cryptococcus* depende de processos de transição do ambiente para o organismo humano para poder se desenvolver nas condições hostis dele. Para isso, o gênero *Cryptococcus* desenvolveu diversos fatores de virulência, sendo que os principais são: cápsula polissacarídea, produção de melanina e integridade de parede celular, termotolerância e secreção de enzimas extracelulares. Alguns autores sugerem que este gênero tenha adquirido estes fatores de virulência para proteção e sobrevivência no ambiente, como a produção de melanina, que ocorreu para proteger a célula fúngica da radiação ultravioleta, e a cápsula polissacarídica, que mostrou evitar a fagocitose e ingestão dessa levedura por amebas e nematóides como *Acanthamoeba castellanii* e *Dictyostelium discoideum* [21,22].

### **1.2.3.1. Cápsula fúngica e parede celular**

A cápsula fúngica tem função de proteger a célula contra desidratação e consequentemente atua como uma barreira física que prejudica o mecanismo de fagocitose por leucócitos que está intimamente relacionado com o acesso ao SNC e o estabelecimento da doença. A cápsula é composta majoritariamente por dois polissacarídeos: glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM); além de manoproteínas que representam cerca de 1% da estrutura capsular [12]. As manoproteínas estão associadas com a ativação de células T do sistema imune do hospedeiro e adesão às células epiteliais do pulmão [69, 88]. A GXM representa aproximadamente 90% da composição da cápsula e é reconhecida como o principal fator de virulência do fungo, já que cepas que não expressam essa proteína não apresentam virulência [13]. A espessura da cápsula é muito importante, já que cepas de *C. neoformans* com maior espessura de cápsula apresentaram resistência à anfotericina B,

além de maior virulência [78]. Estudos *in vivo* mostram que a estrutura e espessura da cápsula variam conforme local e estágio de infecção, sugerindo que a cápsula seja determinante para a evasão do fungo do sistema imune [87]. Isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. apresentam com frequência células com espessura de cápsula e corpo aumentados, chamados de células gigantes, que são resistentes à fagocitose (Figura 2) [91, 92]. Duas enzimas são consideradas principais na síntese da cápsula pelo fungo, a xilosiltransferase (Cxt1) e a lactonohidrolase (Lhc1). A inibição da produção destas enzimas resulta na redução da virulência do *Cryptococcus*, sinalizando um possível alvo terapêutico para o tratamento da criptococose [79,80].



**Figura 2.** Imagens de microscopia que comparam tamanho de célula e espessura capsular de *C. neoformans* cultivado *in vitro* (A) em meio Sabouraud e isolados clínicos (B). As imagens A1 e B1 são de microscopia óptica e as imagens A2 e B2 de microscopia eletrônica de varredura. Adaptado de Zaragoza et al. 2010.

Logo após a cápsula, o *Cryptococcus* spp. possui uma parede celular composta por glicanos, quitosana, proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol e melanina. Diversas destas estruturas celulares participam da interação patógeno-células endoteliais do hospedeiro, como a fosfolipase B, a urease e a metaloprotease Mpr1. Sugere-se que a Mpr1 seja capaz de induzir rearranjos no citoesqueleto das células endoteliais para facilitar a permeação do fungo [14, 88, 89]. A urease também é secretada pelo fungo

para provocar a hidrólise da ureia no organismo do hospedeiro, que resulta na formação de amônia e carbamato e facilita a invasão dele no SNC [90].

### **1.2.3.2. Melanina**

Além de proteínas de sinalização, metais essenciais como cobre, zinco e ferro também participam dos mecanismos de virulência do fungo. A resposta imune inata dos vertebrados atua sequestrando metais essenciais em defesa a infecções fúngicas. O *C. neoformans* é capaz de regular a expressão de genes responsáveis pela captação desses pela levedura. A produção de um dos principais fatores de virulência do fungo, a melanina, é realizada por enzimas denominadas lacases. Esta enzima e também outras oxidases, como a Cfo1, presentes no fungo utilizam e promovem a homeostase do ferro e do cobre no *C. neoformans*. A utilização de cobre pela enzima lacase depende da chaperona ATX1 e da ATPase CCC2. A inibição dessas enzimas impede a produção de melanina e faz com que a captação desses metais essenciais se torne um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas [48]. Além disso, a abundância de biodisponibilidade de ferro no organismo do hospedeiro pode favorecer o tropismo da doença ao mesmo tempo que a inibição destes metais, através de compostos quelantes como a 8HQ, pode ser uma estratégia de tratamento para a infecção [14,83].

A melanina está altamente envolvida no processo de resistência do *Cryptococcus* spp. ao sistema de defesa mamífero. Caracterizada como uma molécula antioxidante, a melanina confere proteção contra às espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos, contribuindo para a evasão do fungo da fagocitose e consequente disseminação extrapulmonar [14, 21, 88]. A melanina é sintetizada por enzimas lacases a partir de precursores dopaminérgicos, principalmente o L-DOPA, e a presença aumentada dessa classe de moléculas no SNC é apontada como um facilitador do neutropismo apresentado pelo fungo [14].

### **1.2.3.3. Termotolerância**

Outro fator de virulência importante desenvolvido pelo *Cryptococcus* spp. é a capacidade de se desenvolver a temperaturas entre 37 e 39°C, o que possibilita a infecção do organismo humano pelo fungo. O fator mais frequentemente relacionado à termotolerância, e também capacidade do fungo sobreviver ao estresse gerado pela resposta imunológica do hospedeiro, é a presença de calcineurina, proteína que tem sua sinalização regulada majoritariamente por pelos genes CNA1 e CTS1 que quando silenciados tornam o fungo sensível à temperatura fisiológica de 37°C [50, 51, 55]. Além da calcineurina, mutações dos transposons que levam ao desenvolvimento de resistência a medicamentos, como o 5-fluorouracil e a rapamicina, foram observadas quando o *Cryptococcus* foi incubado a 37°C. Este processo não foi observado em cepas mantidas a 30°C, sugerindo que a mobilização dependente de temperatura de tais elementos transponíveis seja um mecanismo promotor de resistência aos antifúngicos, além de promover a patogênese do microrganismo [49].

Microrganismos patogênicos de diferentes tipos apresentam uma tendência a desenvolver mecanismos compartilhados de virulência entre si. Essas características em comum podem variar desde o local de infecção até o padrão de indução da resposta imune. Mecanismos de resistência semelhantes aos apresentados pelo *C. neoformans* foram observados em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Dentre os mecanismos mais importantes em comum, destaca-se a capacidade de inibição da resposta imune no hospedeiro através da perturbação da produção de TNF- $\alpha$  por células *natural killer* e de fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF). Além desses, a composição da cápsula do *Cryptococcus* spp. rica em manoproteínas é comparável com a composição dos polissacarídeos extraídos da cápsula do *M. tuberculosis* [28].

#### **1.2.4. Tratamento**

Em relação à meningite criptocócica, as diretrizes mais atuais recomendam realizar o tratamento em três etapas: indução, consolidação e manutenção, respectivamente. Um dos objetivos deste tratamento é utilizar antifúngicos com mecanismos de ação





Mais da metade dos pacientes ainda positiva para a presença do fungo no fluido cerebrospinal após a terapia de indução [64]. Por esse motivo, a fase de consolidação é caracterizada pelo foco no tratamento da causa da imunossupressão (como a terapia antirretroviral no caso de portadores de HIV) e redução dos antifúngicos, porém por um período mais longo do que a fase anterior. Essa fase é realizada com fluconazol, um antifúngico de amplo espectro que faz parte da classe dos azóis. Ele atua na rota biossintética do ergosterol – principal esterol de membrana plasmática fúngica inibindo a remoção oxidativa da metila do lanosterol pela enzima lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase.

Além de desestabilizar a membrana plasmática, a inibição da lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase causa acúmulo de 14- $\alpha$ -metil-3,6-diol na célula fúngica, um componente tóxico ao fungo [66, 101]. Administra-se cerca de 800 mg por dia durante um período de 8 a 12 semanas. Após esse período, pacientes imunocomprometidos permanecem sob risco de recidiva da doença. Assim, a fase de manutenção se dá pela redução da dose diária de fluconazol para 200 mg e é finalizada somente quando o paciente esteja estável (carga viral totalmente suprimida) e com contagem de células CD4 seja  $\geq 100/\mu\text{L}$  ou  $200/\mu\text{L}$  para quando o teste de carga viral não for uma opção. Essa última fase costuma ter duração de aproximadamente um ano [26,62,63].

Quanto à criptococose não meníngea, sugere-se que o tratamento seja realizado com fluconazol, iniciando com doses iniciais de 800 mg ao dia com retirada gradual do fármaco. Já para casos de criptococoma, sugere-se que o manejo seja similar ao da meningite criptocócica, considerando o quadro clínico do hospedeiro, já que o itraconazol apresenta maiores riscos de interações medicamentosas com antivirais utilizados em algumas terapias antirretrovirais [24, 63].

Observa-se que o tratamento para a criptococose é complexo, bastante delicado e demorado, sendo necessário considerar a disponibilidade e toxicidade dos medicamentos em conjunto com o quadro clínico do paciente. Ainda, corroborando para um cenário desfavorável, o gênero *Cryptococcus* apresenta resistência intrínseca às equinocandinas, única classe nova de antifúngicos aprovada na última década. Tais fatos

evidenciam a necessidade de desenvolvimento de novas moléculas com atividade anti-*Cryptococcus* [2].

#### 1.2.4.1. Resistência e limitações

A resistência antimicrobiana aumenta intrinsecamente ao longo dos anos, devido ao uso diário de antimicrobianos e ao processo adaptativo natural das espécies. No entanto, a principal causa para o surgimento de organismos multirresistentes é o uso indevido e excessivo de antimicrobianos, o que torna a resistência antimicrobiana uma das 10 maiores ameaças à saúde global. Neste contexto, a recente pandemia de COVID-19 também contribuiu para o aumento da resistência antimicrobiana – como a multi-resistência a fármacos azólicos, principalmente pelo alto uso de antimicrobianos em pacientes sem infecção secundária. Além de diminuir as chances de tratamentos bem sucedidos, aumentando o número de mortes, os tratamentos tornam-se mais longos resultando em internações hospitalares por maiores períodos e medicamentos mais caros, fazendo com que o impacto na economia seja bastante significativo [1,61,76].

Relatos de resistência de cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. ao antifúngico fluconazol têm sido reportados com frequência. Em um estudo publicado em 2019 que considerou 11049 isolados de *Cryptococcus*, Chesdachai e colabores relatam que a concentração inibitória mínima média para 50% dos isolados (CIM50) que era de 4 µg/mL entre 2000 e 2012 aumentou para 8 µg/mL entre 2014 e 2018. Outro estudo realizado na África do Sul também relata valores de CIM50 e CIM90 (concentração mínima capaz de inibir o crescimento de no mínimo 90% dos isolados) estavam maiores em 2017 em comparação a 2007, sugerindo que a dose recomendada de fluconazol atualmente pode não ser mais adequada, levando ao aumento de dose do fármaco e, conseqüentemente, toxicidade do tratamento [25,77].

Além da resistência e de apresentar baixíssima biodisponibilidade oral, a alta afinidade da anfotericina B com o ergosterol leva à interação deste fármaco, em escala menor,

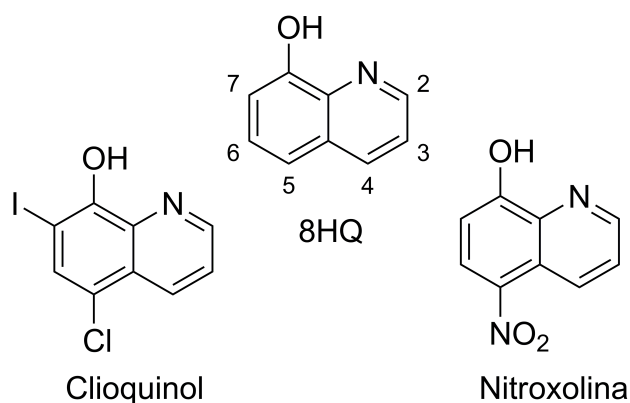
com o colesterol da membrana celular de mamíferos, sendo a principal causa da nefrotoxicidade [93]. Quando administrada apenas na forma endovenosa para criptococose, a anfotericina B é altamente nefrotóxica e apresenta baixo índice terapêutico, limitando seu uso por mais de uma semana de tratamento. Até mesmo o guia para manejo da criptococose em portadores de HIV da OMS considera necessário um rígido acompanhamento do paciente sob administração de anfotericina B, que inclui suplementação com eletrólitos e monitoramento de níveis séricos de hemoglobina, creatinina e potássio devido à provável causa de anemia severa e insuficiência renal [26].

### **1.2.5. Novos compostos**

A descoberta de novas pequenas moléculas com novos mecanismos de ação se mostra favorável para o cenário atual da criptococose. Derivados quinolínicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas. A 8HQ (Figura 4) e seus derivados são protagonistas de muitos estudos devido às suas atividades antifúngica [33,34,35], antibacteriana [30], antiparasitária [31], antioxidante e demonstram interessante atividade para o tratamento da doença de Alzheimer [29,32]. Joaquim e colaboradores apontaram a prevalência de estudos com derivados de 8HQ que apresentam atividade antimicrobiana [94].

Adicionalmente, dois derivados de 8HQ são atualmente fármacos de uso clínico, corroborando para o potencial farmacológico da molécula, são eles: clioquinol e nitroxolina. O clioquinol é um derivado halogenado que foi utilizado entre os anos 1950 e 1960 como antiparasitário oral no tratamento e prevenção de amebíase. No entanto, foi retirado do mercado na década de 70 devido a relatos de casos de neuropatia mielo-óptica subaguda (SMON) em pacientes japoneses, sendo comercializado atualmente apenas em formulações tópicas [38]. O clioquinol continua sendo estudado atualmente, pois apresenta atividade biológica relevante, como atividade anticancer e terapêutica contra a doença de Alzheimer [36,37]. Além disso, o mecanismo que leva à neurotoxicidade do clioquinol não é conclusivo e sugere-se que descendentes japoneses

tenham predisposição genética à neurotoxicidade causada pelo clioquinol [39]. A atividade anti-*Candida* e antidermatofítica do clioquinol foi avaliada por Pippi e colaboradores, apresentando valores de CIM90 entre 0,25 e 2 µg/ml, além de apresentar atividade fungicida contra *Trichophyton mentagrophytes* [34].



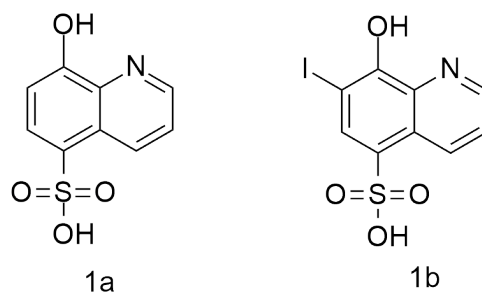
**Figura 4.** Representação da estrutura molecular da 8-hidroxiquinolina (8HQ), do clioquinol e da nitroxolina.

Já a nitroxolina (Figura 4), derivado não-halogenado da 8-hidroxiquinolina, se destaca por apresentar bom potencial antimicrobiano e bom índice de segurança terapêutica. É utilizada há mais de cinco décadas no tratamento de infecções do trato urinário (ITU) na Europa [40,41,42]. Um estudo realizado por Naber e colaboradores em 2014 demonstrou que a nitroxolina apresentou-se igualmente eficaz ao norfloxacinol e ao cotrimoxazol na eliminação de bacteriúria no tratamento de ITU não complicada. Os autores ressaltam que o aumento global no índice de resistência para o cotrimoxazol e as fluoroquinolonas não ocorre para a nitroxolina [43]. Interessantemente, a nitroxolina já foi reportada como ativa contra *Candida auris*, um fungo leveduriforme assim como o *Cryptococcus* e que é multiresistente [104]. Devido à sua atividade quelante de cátions, por ser um derivado 8-hidroxiquinolínico, a nitroxolina também foi considerada um agente muito eficaz contra isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, um importante formador de biofilme em dispositivos médicos [44].

A obtenção de derivados substituídos nas posições 5 e 7 da 8HQ é mais favorável, já que a hidroxila na posição 8 é um orientador para substituições em *orto* e *para* [103].

Assim, a avaliação destes derivados é uma boa alternativa na busca de novos compostos ativos. Lam e colaboradores reportaram que o derivado 5,7-dibromoquinolin-8-ol foi mais ativo do que derivados não-substituídos nestas posições contra cepas de *Staphylococcus aureus*, considerado o principal causador de infecção nosocomial [45].

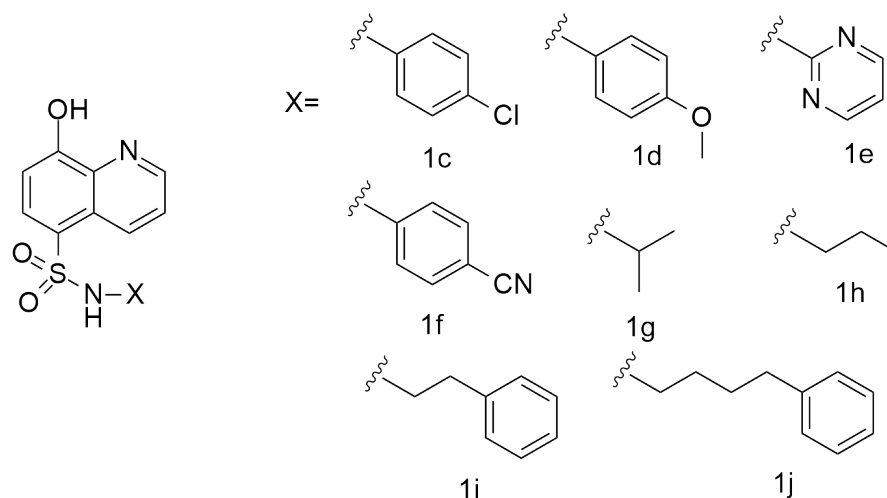
Diversos estudos comparam a atividade de diferentes substituintes nas posições 5 e 7 da 8HQ contra microrganismos patogênicos. Ácidos sulfônicos derivados de 8HQ, como substituintes na posição 5, apresentaram boa atividade contra as leveduras *Candida albicans* e *C. glabrata*, sendo que o ácido 8-hidroxi-5-quinolinassulfônico **1a** demonstrou ser mais potente, com CIM de 4.44  $\mu\text{M}$ , do que seu derivado 7-iodo substituído **1b** (Figura 5). Além disso, estes derivados não apresentaram toxicidade em avaliação histopatológica de tecido suíno [94]. A fim de contornar o caráter ácido e provável ionização destas moléculas em pH biológico, nosso grupo de pesquisa também tem avaliado a atividade de derivados 5-sulfonamida de 8HQ contra patógenos fúngicos como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Microsporium canis* e *Microsporium. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton. rubrum*.



**Figura 5.** Representação da estrutura química dos derivados 8-hidroxi-5-quinolinassulfônico (**1a**) e 8-hidroxi-7-iodo-5-quinolinassulfônico (**1b**).

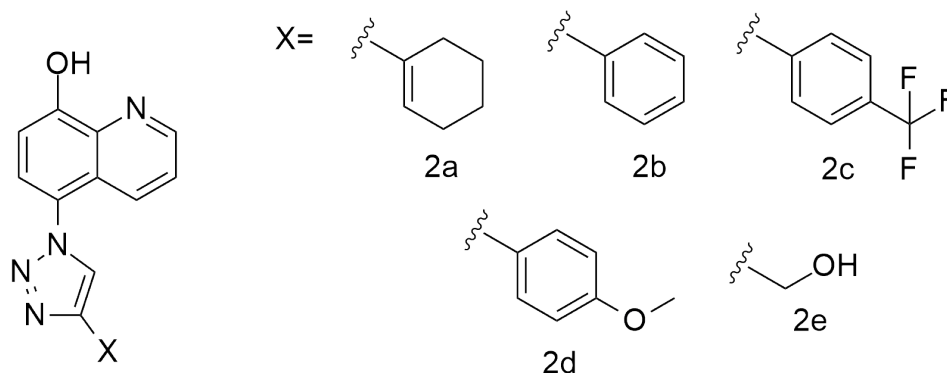
Foram avaliados derivados 8-hidroxiquinolina-5-sulfonamida-N-substituídos com grupamentos aromáticos e alifáticos (**1c** - **1h** Figura 6). O derivado **1c**, contendo um clorobenzeno como substituinte da sulfonamida, foi o mais ativo contra todas as cepas testadas, com CIMs de 3 - 12  $\mu\text{M}$  para fungos, seguido do derivado **1d**, com CIMs de 12,1 - 48,5  $\mu\text{M}$ , inclusive para cepas resistentes ao fluconazol. No entanto, o composto **1d** atingiu o efeito inibitório máximo com menor concentração do que o derivado **1c** na

modelagem farmacocinética. Sendo assim, os derivados **1c** e **1d** são bons candidatos a antifúngicos [35].



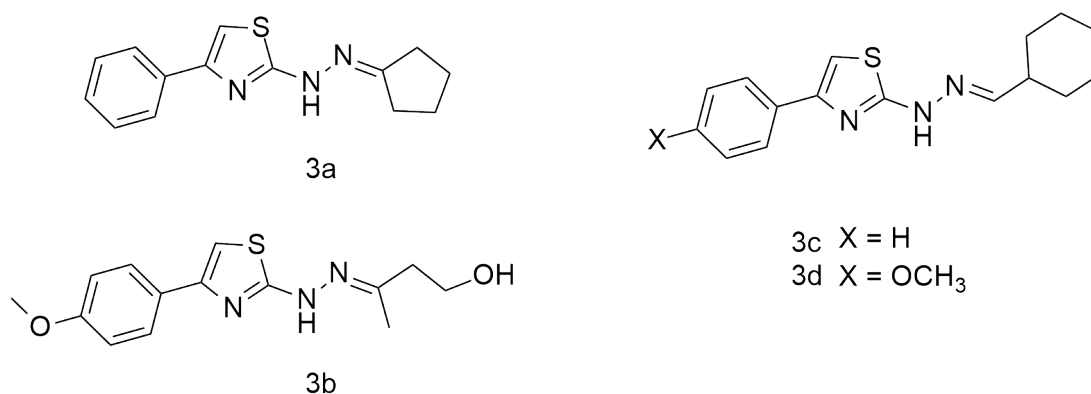
**Figura 6.** Representação da estrutura química dos derivados 8-hidroxiquina-5-sulfonamidas testados por Joaquim e colaboradores (2019) e Musiol e colaboradores (2010).

Musiol e colaboradores também avaliaram derivados 8-hidroxiquinolina-5-sulfonamida-N-substituídos com grupamentos aromáticos (**1i** e **1j**, Figura 6). Neste caso, o grupamento aromático foi espaçado do nitrogênio da sulfonamida por duas e quatro ligações de carbono, as quais resultaram em redução da atividade destes compostos contra *Candida* sp. e dermatófitos [105]. Além de não apresentar citotoxicidade, nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que o derivado **1c** foi ativo contra a formação de biofilmes de *Candida albicans* em CIM baixa (3 – 12  $\mu$ M) e também apresentou efeito sinérgico com fluconazol, sugerindo que o mecanismo de ação dos compostos seja diferente [106]. Atividades antifúngicas interessantes também foram observadas para derivados com substituintes azólicos na posição 5 da 8HQ (**2a** – **2e**, Figura 7), dos quais a melhor atividade observada foi dos derivados N-sutituídos com grupamentos aromáticos, como os derivados **2b** e **2c**.



**Figura 7.** Representação da estrutura química dos derivados 8-hidroxiquina-5-triazóis testados por Silva e colaboradores (2021).

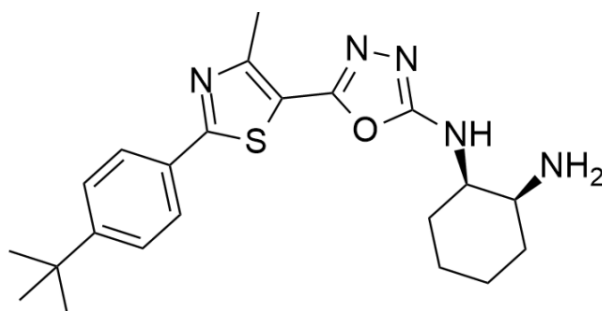
Em estudos realizados por Sá e colaboradores, avaliou-se a atividade anti-*C. neoformans* e anti-*C. gattii* de derivados heterocíclicos tiazólicos. Dos treze compostos avaliados, os derivados **3a**, **3b**, **3c** e **3d** (Figura 8) apresentaram interessante atividade contra as cepas de *Cryptococcus* spp. testadas, com valores de CIM menores do que o fluconazol, variando de 1-3,4  $\mu\text{M}$ , 0,9-1,7  $\mu\text{M}$ , 0,7-2,2  $\mu\text{M}$  e 1,4-4,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Além disso, não apresentaram citotoxicidade para células mamíferas e as curvas de morte obtidas na avaliação farmacocinética são comparáveis às curvas dos fármacos utilizados atualmente: anfotericina B e fluconazol [46]. Também, os autores comentam que o derivado **3a** já foi reportado anteriormente com interessante atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus flavus* [106].



**Figura 8.** Representação da estrutura química dos compostos **3a**, **3b**, **3c** e **3d** testados por Sá e colaboradores (2015) contra *C. cryptococcus* e *C. gattii*, que apresentaram valores de CIM menores que o fluconazol no mesmo estudo.



O derivado **3a** também apresentou recentemente atividade anti-*Cryptococcus* e anti-*Candida* em estudos *in vivo*, resultando no aumento de sobrevivência de *Galleria mellonella* após infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* e *C. albicans* e redução da carga fúngica em modelos murinos [108]. Outro estudo realizado por Hagra e colaboradores também demonstrou que derivados de oxadiazoliltiazol, em especial o derivado **3e** com um grupamento p-terc-butil-fenil ligado ao tiazol (Figura 9), apresentaram atividade antifúngica interessante contra cepas de isolados clínicos de *Candida spp*, *Cryptococcus spp* e *Aspergillus fumigatus*. O derivado **3e** também apresentou não ser tóxico contra células Vero e células humanas (Caco-2). Os valores de CIM obtidos variaram entre 0,125 µg/mL para *C. glabrata*, 8,0 µg/mL para *C. albicans* e *A. fumigatus*, também apresentando atividade na faixa de micromolar baixo, como 2,0 µg/mL para *C. auris*. Além disso, este derivado superou o fluconazol na inibição de produção de biofilme por *Candida spp*. [47].



**Figura 9.** Representação da estrutura química do derivado **3e** testado por Hagra e colaboradores (2020).

Derivados de 2-aminotiazol, em sua maioria, apresentam etapas simples e, conseqüentemente de baixo custo, de síntese química, sendo considerados versáteis e bons candidatos a grupos farmacofóricos na busca de novas moléculas [71]. Além disso, outros trabalhos também relatam atividade antifúngica interessante de derivados de 2-amino-4-feniltiazol contra cepas de *C. albicans*, com CIMs menores do que o fluconazol, que variam entre 0.015–7.81 µg/ml [70, 72].

Baseando-se na boa atividade antifúngica já apresentada por derivados 8-hidroxiquinolina-5-sulfonamidas em estudos do nosso grupo de pesquisa, em especial o

derivado **1c**, na atividade antifúngica apresentada por derivados azólicos de 8-hidroxiquinolina e atividade anti-*Cryptococcus* apresentada por derivados feniltiazólicos, a síntese de novos derivados que combinem as características químicas destes composto pode ser uma alternativa interessante para a busca de novas moléculas com atividade anti-*Cryptococcus*.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 33 – 48, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de descrição da síntese química de novos compostos a partir da molécula 8-hidroxiquinolina, da purificação e posterior caracterização deles. Os novos compostos obtidos tiveram atividade antifúngica testada contra uma cepa de *Cryptococcus neoformans* e uma cepa de *Cryptococcus gattii*.

































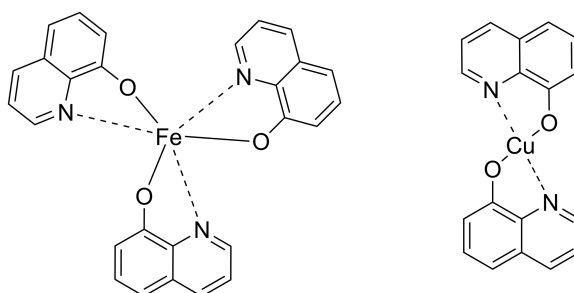


### 3. Discussão geral

#### 3.1. Mecanismo de ação

A 8HQ é um ionóforo de alguns metais essenciais, como o cobre, promovendo alterações no metabolismo deste metal no fungo. Ela é capaz de aumentar a concentração intracelular de cobre independente da ação de transportadores de cobre. Durante a infecção por *Cryptococcus* spp. Os macrófagos alveolares compartimentam o cobre em fagossomos e metalotioneínas, como MT1 e MT2, são necessárias para a sobrevivência do patógeno. A transcrição de MT1 e MT2 é altamente ativada no fungo durante a infecção nos pulmões na tentativa de manter a homeostase de cobre [84]. Assim como a presença de macrófagos, a 8HQ também foi capaz de induzir a expressão de MT1 e MT2, devido à sua atividade ionofórica que sobrecarrega os mecanismos de resistência ao cobre do *Cryptococcus*, induzindo a morte do fungo [82].

Diversos estudos sugerem que a atividade antimicrobiana da 8HQ se dá pela capacidade quelante da molécula (Figura 10) [97]. Em estudos que avaliariam derivados de 8HQ para atividade antimicrobiana, nota-se que substituições no nitrogênio da piridina e na hidroxila reduzem a concentração mínima de inibição desses compostos contra os microrganismos, fortalecendo a importância da atividade quelante na molécula [94]. A Figura 10 ilustra a interação de 8HQ com ferro e cobre, através de ligações covalentes e coordenadas, onde duas ou mais moléculas de 8HQ compartilham seus elétrons com o íon metálico [103].



**Figura 10.** Esquema da interação da 8-hidroxiquinolina com os metais Ferro e Cobre, através de ligações covalentes coordenadas (linha pontilhada) e ligações covalentes (contínua).

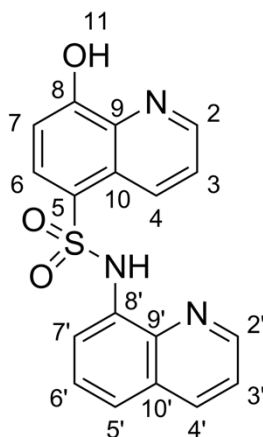
Adicionalmente, ensaios de mecanismo de ação realizados por You e colaboradores sugerem que o derivado halogenado de 8HQ clioquinol seja capaz de interferir na homeostase de íons, atuando como quelantes de metais para zinco, cobre e ferro [102]. Ainda, a síntese de melanina por meio de lacases é dependente de cobre e, tanto a ausência da expressão de lacases, com a indisponibilidade de melanina, são capazes de tornar a cepa avirulenta [95,96]. Nota-se que a rota de síntese de produção de melanina utilizada pelo *Cryptococcus* spp. não é a mesma rota realizada por mamíferos, o que torna essa via promissora para o desenvolvimento de novos fármacos.

Além da atividade quelante, alguns estudos demonstram atividade interessante de derivados sulfonamidas contra enzimas anidrase carbônicas do fungo *Cryptococcus* spp. As anidrases carbônicas presentes neste fungo são essenciais para a adaptação ambiente-hospedeiro, já que a concentração de CO<sub>2</sub> em organismos mamíferos é maior do que no ambiente. Já é sabido que a inibição desta enzima reduz o crescimento do fungo *in vitro*, tornando-a um alvo interessante [100]. Diversos derivados de sulfonamida demonstraram inibir a enzima anidrase carbônica Can2 presente no *C. neoformans* e, interessantemente, a adição de um benzeno como substituinte na sulfonamida aumentou ligeiramente a atividade do derivado [98, 99]. Este fato corrobora a melhor atividade dos derivados PH311 e PH318 em relação aos derivados com substituintes heterocíclicos na sulfonamida.

### **3.2. Elucidação estrutural do derivado**

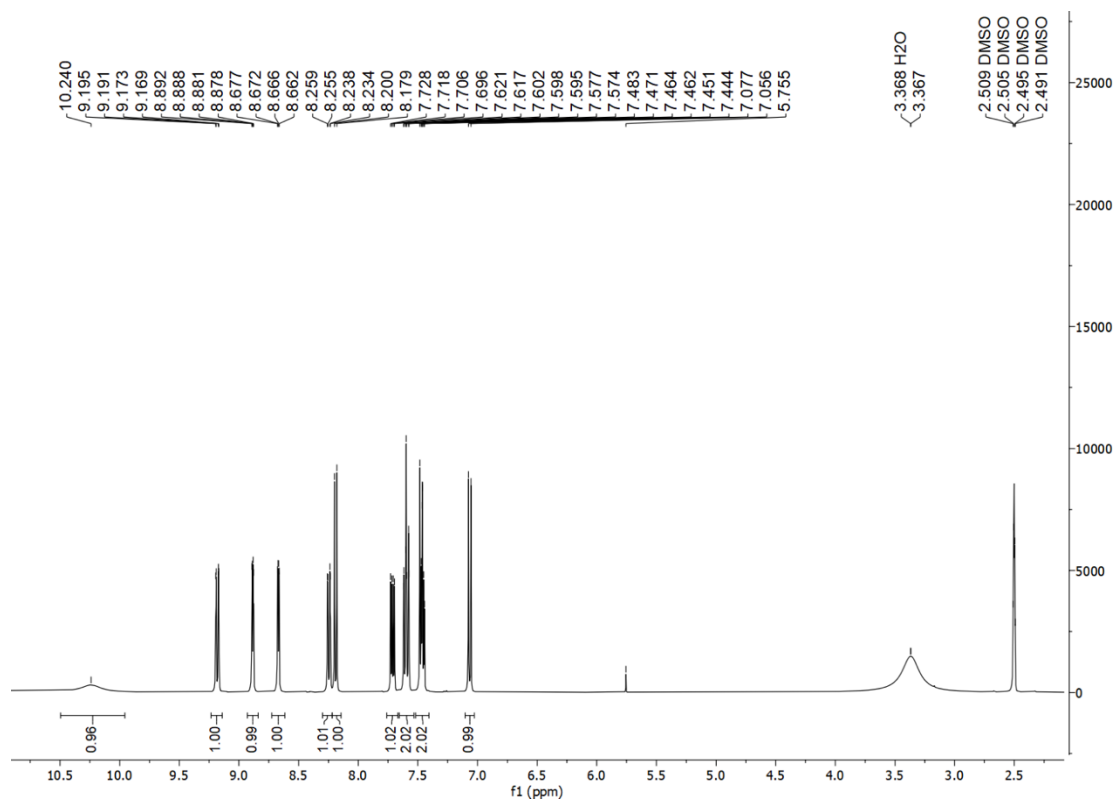
Em relação aos derivados de 8HQ obtidos neste estudo, a elucidação estrutural de todos foi realizada através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C) e foi escolhido o derivado PH353 (Figura 11) como representante da série para discussão da elucidação através do método bidimensional desta técnica. Na Figura 11 encontra-se a estrutura química do derivado PH353 com as atribuições numéricas pertinentes aos sinais de hidrogênio (H) e carbono (C) da

molécula, as quais estão apenas para facilitar a discussão, não estando de acordo com a IUPAC.



**Figura 11.** Representação da estrutura química do derivado PH353.

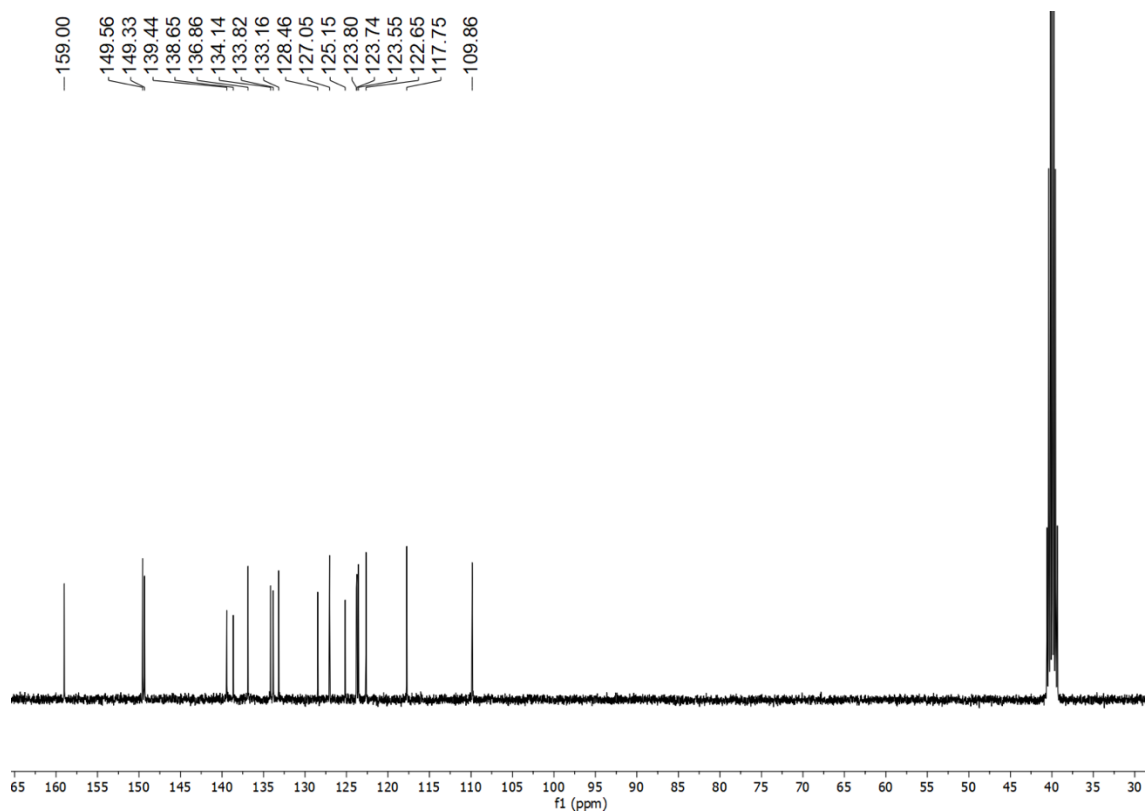
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 12) é possível atribuir o sinal em  $\delta$  10,24 ppm ao hidrogênio H11 da hidroxila. Todos os hidrogênios restantes presentes neste composto são aromáticos (hidrogênios desblindados) e seus sinais aparecem no espectro na região de maior deslocamento químico e cada hidrogênio resulta em um sinal. Já na região de menor deslocamento químico, observam-se apenas os sinais referentes ao solvente DMSO deuterado em  $\delta$  2.50 ppm e à água residual dele em  $\delta$  3.34 ppm [85]. Dois sinais são rapidamente passíveis de caracterização, são eles H6 e H7, já que são os únicos que apresentam multiplicidade igual a dois, que são atribuídos aos dois dupletos em  $\delta$  8.19 e  $\delta$  7.07 ppm, respectivamente, devido ao deslocamento químico.



**Figura 12.** RMN  $^1\text{H}$  em DMSO- $d_6$  do derivado PH353.

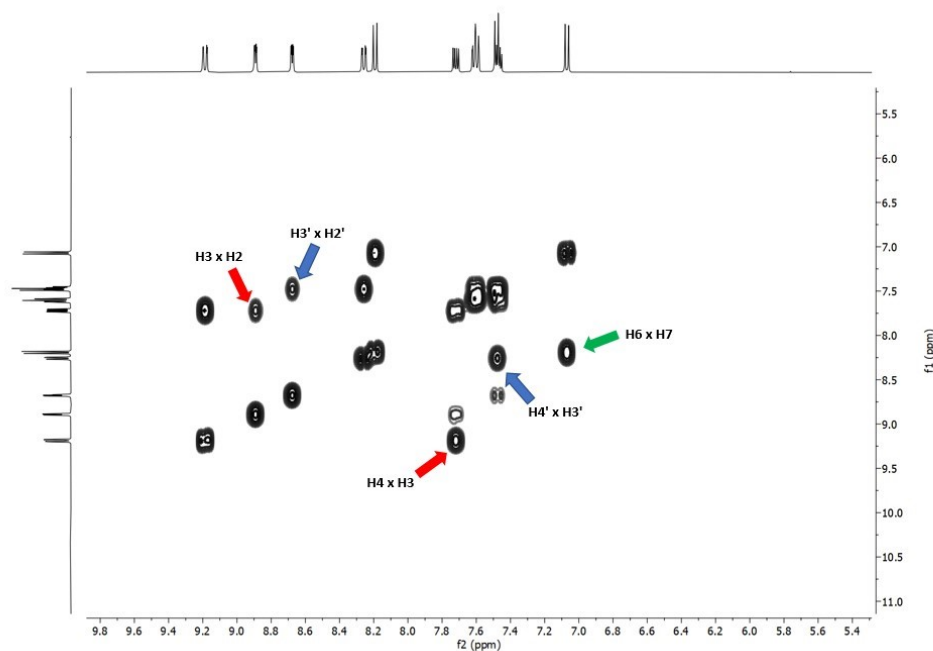
Os sinais correspondentes aos demais hidrogênios da molécula apresentam padrões de acoplamento mais complexos e algumas vezes aparecem sobrepostos, como multipletos. Os hidrogênios do anel piridínico das quinolinas resultam em dupletos duplos e, por serem química e magneticamente diferentes entre si, apresentam padrões de acoplamento característicos -  $J_{2-3} \sim 4,0$  Hz,  $J_{3-4} \sim 8,0$  Hz e  $J_{2-4} \sim 1,5$  Hz [86]. No entanto, por se tratar de uma molécula com dois núcleos quinolínicos, a atribuição de todos esses sinais só é possível através de análises bidimensionais de RMN.

Na análise de RMN  $^{13}\text{C}$  é possível identificar dezoito sinais referentes aos carbonos presentes na estrutura, todos na região acima de 100 ppm no espectro (Figura 13). O carbono mais desblindado, em  $\delta$  159,0 ppm, corresponde ao C8, pois está ligado ao oxigênio da hidroxila. Os carbonos ligados diretamente aos nitrogênios dos dois anéis piridínicos na posição 2 também se apresentam mais desblindados do que os demais, aparecendo em  $\delta$  149,6 e 149,3 ppm. Os demais carbonos encontram-se entre  $\delta$  139,9 e 109,9 ppm.



**Figura 3.** RMN  $^{13}\text{C}$  em DMSO- $d_6$  do derivado PH353.

Na análise bidimensional, a técnica de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Correlation Spectroscopy) permite identificar átomos de hidrogênio que acoplam entre si no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . No espectro de COSY para o composto PH353 (Figura 14) é possível visualizar um acoplamento entre os dois hidrogênios referentes aos dois dupletos do espectro (seta verde). Estes sinais não apresentam outras interações com os demais, confirmando sua equivalência aos hidrogênios H6 e H7.



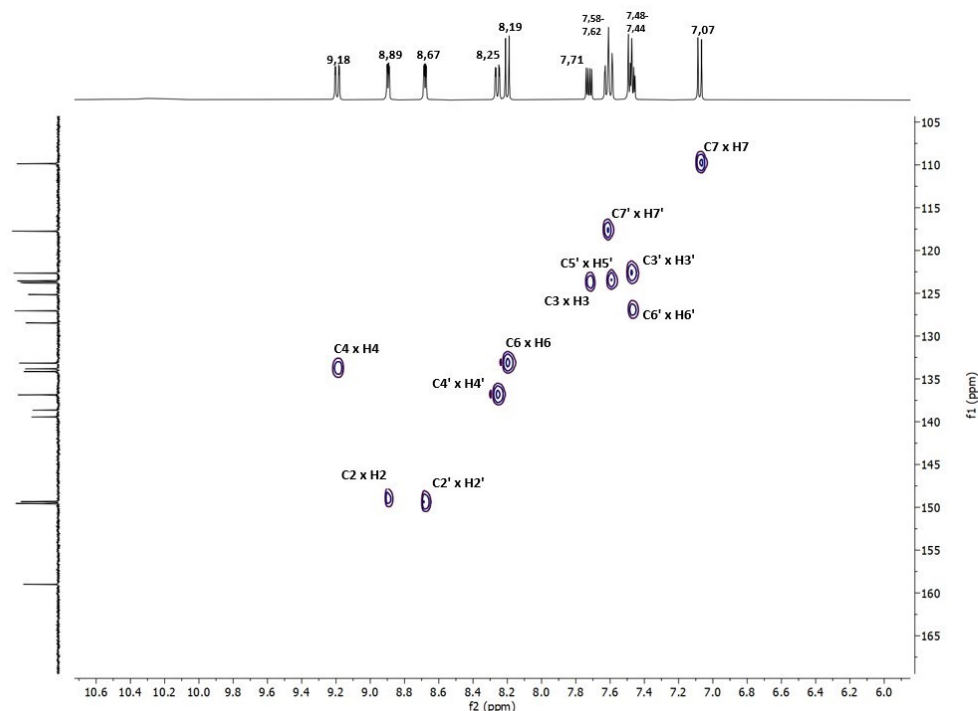
**Figura 14.** RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  em DMSO- $d_6$  do derivado PH353.

Também se observa acoplamento entre os hidrogênios dos dupletos duplos em  $\delta$  9,18 e 7,71 ppm (H4 e H3), assim como entre  $\delta$  8,89 e 7,71 ppm (H2 e H3, setas vermelhas), sugerindo que estes três hidrogênios pertençam ao mesmo núcleo piridínico. Ambos hidrogênios dos sinais em  $\delta$  8,67 e 8,25 ppm (H2' e H4') acoplam com o multiplete em  $\delta$  7,48-7,44 ppm (H3'), sugerindo que aqueles dois e um ou mais hidrogênios do multiplete pertençam ao mesmo núcleo quinolínico. Por fim, os hidrogênios do multiplete em  $\delta$  7,58-7,62 ppm acoplam apenas entre si e com o multiplete em  $\delta$  7,48-7,44 ppm, parecendo pertencer ao mesmo anel.

Através da técnica de análise bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) é possível observar as correlações entre núcleos de dois tipos diferentes, onde um sinal é gerado a cada par de núcleos acoplados. No mapa de contornos de HSQC para o derivado PH353 (Figura 15) é possível atribuir os sinais de carbono em  $\delta$  133,2 e 109,9 ppm a C6 e C7, respectivamente. Observa-se que os sinais de hidrogênio em  $\delta$  8,89 e 8,67 ppm correlacionam com os carbonos em  $\delta$  149,3 e 149,6 ppm (C2 e C2'), respectivamente, sinalizando que equivalem aos hidrogênios H2 e H2'. Neste mapa de contornos também é possível observar que os sinais de carbono em  $\delta$



159,0, 139,4, 138,7, 134,1, 128,5, 125,2 e 123,8 ppm são equivalentes aos carbonos quaternários da molécula ou àqueles que não possuem ligações com hidrogênio.



**Figura 15.** RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  do derivado PH353.

Já na análise bidimensional HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation, 8,0 Hz, Figura 16) é possível detectar correlações heteronucleares em intervalos mais longos (cerca de 2 a 4 ligações). As correlações mais relevantes neste mapa são aquelas entre o carbono em  $\delta$  138,7 ppm (C9) e H7 e os sinais de hidrogênio em  $\delta$  9,18 e 8,89 ppm (H4 e H2). Assim, conclui-se que os hidrogênios em  $\delta$  9,18, 8,89 e 7,71 ppm pertencem ao mesmo núcleo quinolínico que H6 e H7 e, devido ao deslocamento químico e constantes de acoplamento, correspondem a H4, H2 e H3, respectivamente. A partir disso, também é possível a atribuição de H2' e H4' aos sinais  $\delta$  8,67 e 8,25 ppm, respectivamente. Através do mapa de contornos HSQC, agora é possível atribuir os carbonos em  $\delta$  149,3, 123,7, 133,8, 149,6 e 136,9 ppm a H2, H3, H4, H2' e H4', nesta ordem.

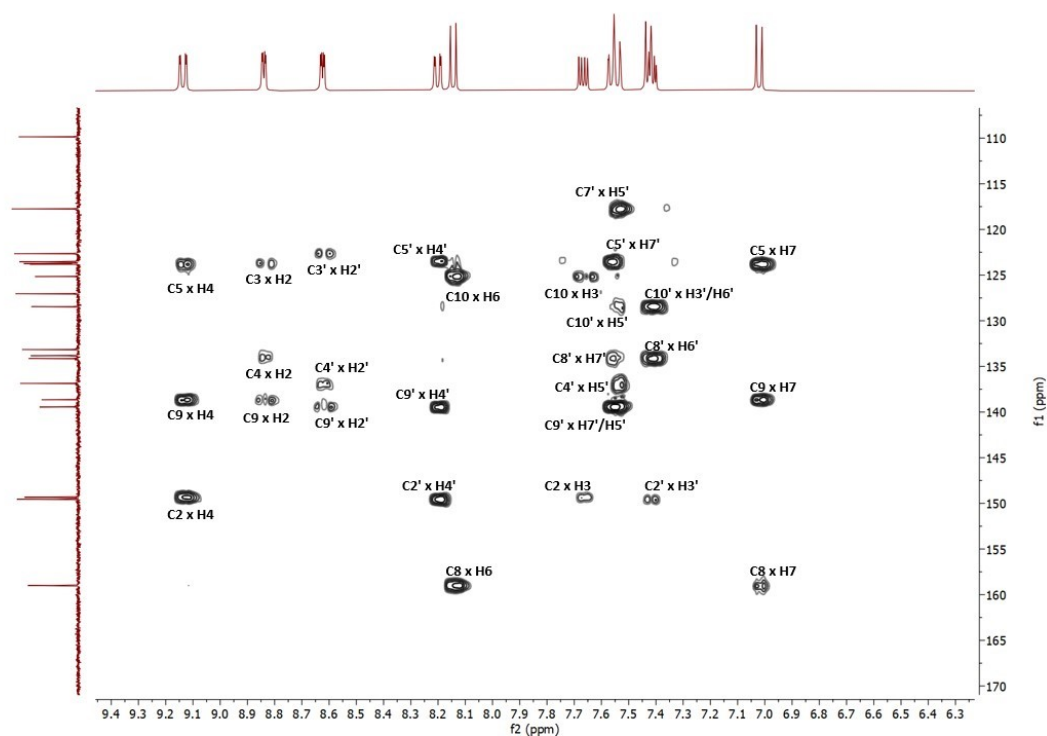


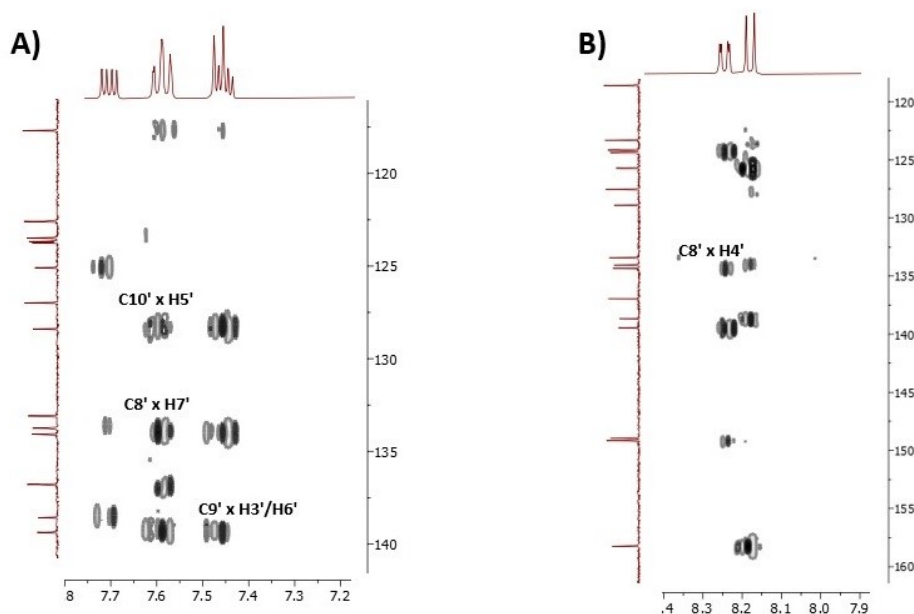
Figura 16. RMN HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (8 Hz) em  $\text{DMSO-}d_6$  do derivado PH353.

No mapa de contornos COSY (figura 14), nota-se que um dos hidrogênios do multipletto em  $\delta$  7,48-7,44 ppm ( $\text{H3}'$  e  $\text{H6}'$ ) correlaciona com  $\text{H2}'$ , sugerindo que um dos hidrogênios deste sinal seja o  $\text{H3}'$ . Além disso, no mapa de contornos HMBC observa-se um acoplamento entre  $\text{H2}'$  e o carbono em  $\delta$  122,7 ppm equivalente a esse multipletto, sendo possível a atribuição deste carbono ao  $\text{C3}'$ .

Sabe-se que o mapa de contornos HMBC nos permite visualizar correlações  $^2J_{\text{CH}}$ ,  $^3J_{\text{CH}}$  e  $^4J_{\text{CH}}$ , não sendo possível distingui-las. No entanto, para uma análise padrão com constante de acoplamento 8,0 Hz, é importante salientar que correlações  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$  costumam ser mais comuns e mais fortes. Além disso, picos HMBC correspondentes a  $^2J_{\text{CH}}$  em fragmentos aromáticos são frequentemente fracos, enquanto acoplamentos  $^3J_{\text{CH}}$  em aromáticos costumam ser claramente observados [110]. Desta forma, devido a correlações  $^3J_{\text{CH}}$  com  $\text{H2}$ ,  $\text{H4}$  e  $\text{H7}$  e ao deslocamento químico, o sinal do carbono em  $\delta$  138,7 ppm é atribuído ao  $\text{C9}$ . Da mesma forma, o sinal do carbono em  $\delta$  139,4 ppm é atribuído ao  $\text{C9}'$  por apresentar correlações  $^3J_{\text{CH}}$  com  $\text{H2}'$ ,  $\text{H4}'$  e o multipletto em  $\delta$  7,62-7,58 ppm ( $\text{H5}'$  e  $\text{H7}'$ ). Já que o multipletto em  $\delta$  7,48-7,44 ppm ( $\text{H3}'$  e  $\text{H6}'$ ) não apresenta correlação com  $\text{C9}'$  no mapa de contornos HMBC 8 Hz, sugere-se que seus hidrogênios

equivalam a H3' e H6', e o carbono em  $\delta$  127,1 ppm presente neste multiplete seja o C6'.

Ainda, realizou-se um experimento HMBC para o derivado PH353 utilizando 1,0 Hz como constante de acoplamento. Ao contrário do experimento acima, nesse mapa de contornos os acoplamentos  $^2J_{CH}$  e  $^4J_{CH}$  são mais evidentes. Na Figura 17 é possível observar dois acoplamentos que não eram visíveis no experimento da Figura 6, sendo um deles equivalente ao acoplamento  $^4J_{CH}$  entre C9' e H6'/H3' e o outro ao acoplamento também  $^4J_{CH}$  entre C8' e H4'. Além destes, os contornos atribuídos aos acoplamentos  $^2J_{CH}$  entre C8' e H7' e entre C10' e H5' ficaram mais evidentes neste experimento do que naquele realizado com constante de acoplamento 8 Hz, corroborando as atribuições discutidas no parágrafo anterior.



**Figura 17.** Cortes do espectro de RMN HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (1 Hz) em DMSO-*d*<sub>6</sub> do derivado PH353.

Por fim, o mapa de contornos HSQC (Figura 15) indica que o multiplete em  $\delta$  7,62-7,58 ppm (H5' e H7') correlaciona com os carbonos em  $\delta$  123,6 e 117,8 ppm. H4' apresenta correlação  $^3J_{CH}$  com o carbono em  $\delta$  123,6 ppm, permitindo a atribuição deste ao C5' e, conseqüentemente, do carbono em  $\delta$  117,8 ppm ao C7'. Portanto, os hidrogênios H5' e H7' são atribuídos ao multiplete em  $\delta$  7,62-7,58 ppm. Considerando as correlações  $^3J_{CH}$

com H3' e H6', e o deslocamento químico, atribui-se os sinais em  $\delta$  128,5 e 134,1 ppm aos carbonos C10' e C8', nesta ordem. Por fim, observam-se correlações  $^3J_{CH}$  entre H6 e o sinal em  $\delta$  125,2 ppm e entre H7 e o sinal em  $\delta$  123,8 ppm, sugerindo que estes sinais de carbono estejam atribuídos a C10 e C5, respectivamente.

#### 4. Conclusão e perspectiva

Neste trabalho foi descrita a síntese e caracterização de quinze derivados de 8-hidroxiquinolina, dos quais um caracteriza-se como híbrido molecular. Os rendimentos globais das rotas de síntese variaram entre baixo e moderado. Todos os derivados da série foram avaliados *in vitro* contra *C. neoformans* e *C. gattii*. O derivado PH311 foi identificado como o composto mais promissor deste estudo, apresentando resultados melhores do que o fluconazol. Os derivados PH314, PH318 e PH353 que também apresentam características hidrofóbicas no grupo substituinte da sulfonamida, também apresentaram resultados promissores. Por fim, a análise através de microscopia eletrônica de varredura de células de *C. neoformans* tratadas com os derivados PH311 e PH318 revelou que estes foram capazes de reduzir a espessura da cápsula fúngica e a densidade da rede fibrilar polissacarídea da mesma, com efeitos comparáveis à anfotericina B neste experimento.

Serão realizados ensaios *in vitro* para caracterização de ação fungicida ou fungistática dos compostos e microscopia eletrônica de transmissão para avaliar possíveis alterações intracelulares causadas pelos derivados mais ativos.



## 5. Referências

- [1] WHO, Global Health Estimates. “The top 10 causes of death.” *World Health Organization*, 9 dezembro 2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed 12 abril 2021.
- [2] Denning, D. W. “Echinocandin antifungal drugs.” *The Lancet*, vol. 362, no. 9390, 2003, pp. 1142-1141. *Science Direct*.
- [3] Rajasingham, R., et al. “Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis.” *Lancet Infectious Diseases*, vol. 17, no. 1, 2017, pp. 873-81. *PMC*.
- [4] Soares, E. A., et al. “Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study.” *Plos Neglected Tropical Diseases*, vol. 13, no. 7, 2019, -. *PMC*. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007569.
- [5] Reolon, A., et al. *Prevalência de Cryptococcus neoformans nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2004. *SciELO*. Doi: 10.1590/S1676-24442004000500003.
- [6] Park, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23, 525–30 (2009).
- [7] Bratton, E. W. et al. Comparison and Temporal Trends of Three Groups with Cryptococcosis: HIV-Infected, Solid Organ Transplant, and HIV-Negative/Non-Transplant. *PLoS One*, 2012, Doi: 10.1371/journal.pone.0043582.
- [8] Bivanco, F. C. et al. Criptococose cutânea. *Arq Med ABC*. 2006; Vol. 31, Pág.: 102-109.
- [9] Schwartz, S. et al. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. *Lancet Neurology*. 2018; vol. 17, pg. 362-372.
- [12] McFadden, D. O. et al, The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*, *Trends Microbiol*, 2006, Vol. 14, Pág.: 497-505.
- [13] Oliveira, E. S., Identificação *in silico* de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol nas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, Centro de biotecnologia - UFRGS, 2010.
- [14] Esher, S. et al, Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2018, Vol. 113: e180057.

- [15] Bratton, E. W. et al, Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIVnegative/non-transplant, 2012, Vol. 7, e43582.
- [16] Nguyen, M. H. et al. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: results from a multi-center, prospective study, 2010, *The journal of infection*, Vol. 61, pág.: 419-426.
- [17] Perfect, J. R. et al, Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america, *Clin Infect Dis*, Vol. 50, pág.: 291-322.
- [18] Byrnes, E. J. et al, *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals, *Microbes Infect*, 2011, Vol. 13(11), pág.: 895-907.
- [19] Ngamskulrungrroj, P. et al, The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model, *MBio*, 2012; Vol. 3(3), e00103-12.
- [20] Casadevall, A. et al, Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes, *Eukaryot Cell*, 2007; Vol. 6(12), pág.: 2169-74.
- [21] Nosanchuk J. D. e Casadevall A., Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds, *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, Vol. 50(11), pág.: 3519-28.
- [22] Steenbergen J. N. e Casadevall A., The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, *Microbes Infect*, 2003, Vol. 5(7), pág.: 667-75.
- [23] Botts, M. R., Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis, *Eukaryot Cell*, 2009, Vol. 8(4), pág.: 595-605.
- [24] Chen, S.C. et al. Consensus guidelines for the treatment of yeast infections in the haematology, oncology and intensive care setting, *Intern Med J*, 2014 Vol 44.
- [25] Chesdachai, S. et al. Minimum Inhibitory Concentration Distribution of Fluconazole against *Cryptococcus* Species and the Fluconazole Exposure Prediction Model, *Open F Infect Dis*, Vol 6, 2019.
- [26] World Health Organization. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550277>. Acesso em: dezembro de 2021.



- [28] Willcocks, S.; Wren, B. W., Shared characteristics between *Mycobacterium tuberculosis* and fungi contribute to virulence, *Future Microbiology*, 2014, Vol. 9(5), pág.: 6657-668.
- [29] Knez, D. et al. Biological Evaluation of 8-Hydroxyquinolines as Multi-Target Directed Ligands for Treating Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.*, Vol 16, 2019
- [30] El Faydy, M. et al. Synthesis and investigation of antibacterial and antioxidants properties of some new 5-substituted-8-hydroxyquinoline derivatives. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, Vol 8, 2017.
- [31] Scalese, G. et al. Exploring oxidovanadium (IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New J Chem*, 2019.
- [32] Yang, X. et al. Novel 8-hydroxyquinoline derivatives targeting  $\beta$ -amyloid aggregation, metal chelation and oxidative stress against Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*, Vol 26, 2018.
- [33] Pippi, B. et al. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. *Journal of Applied Microbiology*, 2019
- [34] Pippi, B. et al. Evaluation of 8-hydroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. *Medical Mycology*, Vol 55, 2017
- [35] Joaquim, A.R. et al. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol Drug Des.*, Vol 93, 2019.
- [36] Ding, W. et al. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res.* Vol. 8, 2005, pág.: 3389-95.
- [37] Regland, B. et al. Treatment of Alzheimer's Disease with Clioquinol. *Dement Geriatr Cogn Disord*, Vol 12, 2001.
- [38] Bareggi, S.R., Cornelli, U. Clioquinol: review of its mechanisms of action and clinical uses in neurodegenerative disorders. *CNS Neurosci Ther*, Vol 18, 2010
- [39] Mao, X. et al. The toxicology of Clioquinol. *Toxicology Letters*, Vol 182, 2008
- [40] Laurie, M.T. et al. Functional Assessment of 2,177 U.S. and International Drugs Identifies the Quinoline Nitroxoline as a Potent Amoebicidal Agent against the Pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *mBio*, Vol 9, 2018

- [41] Cherdtrakulkiat, R. et al. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports*, Vol 6, 2016
- [42] Cherdtrakulkiat, R. et al. Nitroxoline: a potent antimicrobial agent against multidrug resistant Enterobacteriaceae. *EXCLI J*, 2019
- [43] Naber, K., G. et al. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *Infectious Diseases*, Vol 14, 2014
- [44] Sobke, A. et al. The Urinary Antibiotic 5-Nitro-8-Hydroxyquinoline (Nitroxoline) Reduces the Formation and Induces the Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Chelation of Iron and Zinc. *AAC Journals*, Vol 56, 2012
- [45] Lam, K-H. et al. Preparation of 8-hydroxyquinoline derivatives as potential antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol 24, 2014
- [46] Sá, N., P. et al. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro, Vol 102, 2015
- [47] Hagra, M. et al. Oxadiazolylthiazoles as novel and selective antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol 189, 2020
- [48] Ding, C. et al. Essential Metals in *Cryptococcus neoformans*: Acquisition and Regulation. *Curr Fungal Infect Rep*, Vol 8, 2014, pág.: 153-162.
- [49] Gusa, A. et al. Transposon mobilization in the human fungal pathogen *Cryptococcus* is mutagenic during infection and promotes drug resistance *in vitro*. *Pnas*, Vol. 117, 2020, pág.: 9973–9980.
- [50] Juvvadi, P. R. et al. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence*, Vol. 8, 2017, pág.: 186–197.
- [51] Park, H. et al. Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. *PLoS Pathog*, Vol 12, 2016.
- [55] Fox, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, Vol. 39, pág.: 835-49, 2001.
- [56] Refai, M. K. et al. Cryptococcosis in Animals and Birds: A Review. *European Journal of Academic Essays*, Vol. 4, pág.: 202-23, 2017.

- [57] Olszewski, M.A., et al. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiology*. Vol 5, 2010, DOI: 10.2217/fmb.10.93.
- [58] Maziarz, E.K., Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, Vol 30, 2016, PMID: 26897067.
- [59] Firacative, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol 113, 2018, DOI: 10.1590/0074-02760170554.
- [60] Lai, C. et al. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol 57, Edição 4, 2021.
- [61] World Health Organization. Antimicrobial resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: dezembro de 2021.
- [62] Tenforde, M. W. et al. Treatment for HIV-associated cryptococcal meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*. Vol 7, 2018.
- [63] Skipper, C. et al. Diagnosis and Management of Central Nervous System Cryptococcal Infections in HIV-Infected Adults. *Journal of Fungi*, Vol 5, 2019.
- [64] Kambugu, A. et al. Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* Vol 46, 2008, pág.: 1694–1701.
- [65] Fernandes, C. M. The future of antifungal drug therapy: novel compounds and targets. *Antimicrobial chemotherapy*. Vol 65, 2021.
- [66] Perfect, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discovery*. Vol 16, 2017, pág.: 603-616.
- [67] Bongomin, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of Fungi*. Vol 3, 2017.
- [69] Teixeira, P. A. C. et al. Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. *Front Cell Infect Microbiol*. Vol 4, 2014.
- [70] Bikobo, D. S. N. et al. Synthesis of 2-phenylamino-thiazole derivatives as antimicrobial agents. *Journal of Saudi Chemical Society*. Vol 21, 2017, pág.: 861-868.
- [71] Das, D. et al. Recent developments of 2-aminothiazoles in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol 109, 2016, pág.: 89-98.

- [72] Biernasiuk, A. et al. Synthesis, antimicrobial activity, and determination of the lipophilicity of ((cyclohex-3-enylmethylene)hydrazinyl)thiazole derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. Vol 28, 2019, pág.: 2023-2036.
- [73] Gullo, F.P., Rossi, S.A., Sardi, J.C.O. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 1377–1391 (2013).
- [74] Selb, R. et al. Molecular typing and in vitro resistance of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates obtained in Germany between 2011 and 2017. *Intern J Medical Microbiology*, Vol 309, 2019, DOI:10.1016/j.ijmm.2019.151336
- [75] Colombo, G.; Táparo, C.V.; Araújo Júnior, E.C.; Makatu, M.Y.; Santos, F.S.; Marinho, M. Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas ambientais de pombos (*Columba livia domestica*), *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Vol 67, 2015
- [76] Lai, C.C.; Chen, S.Y.; Ko, W.C.; Hsueh, P.R. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 57, Issue 4, 2021
- [77] Naicker, S.D.; Mpenbe, R.S.; Maphanga, T.G.; Zulu, T.G.; Desanto, D.; Wadula, J.; Mvelase, N.; Maluleka, C.; Reddy, K.; Dawood, H.; Maloba, M.; Govender, N.P.; for GERMS-SA. Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020, Vol 14, e0008137.
- [78] Cordoba, S., Afeltra, J. & Vitale, R. G. Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time-kill curve methodology against large and small capsulate *C. neoformans* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 71, 260–262 (2011)
- [79] Park, Y. D. et al. A role for LHC1 in higher order structure and complement binding of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *PLoS Pathog*. 10, e1004037 (2014).
- [80] Klutts, J. S. & Doering, T. L. Cryptococcal xylosyltransferase 1 (Cxt1p) from *Cryptococcus neoformans* plays a direct role in the synthesis of capsule polysaccharides. *J. Biol. Chem*. 283, 14327–14334 (2008).
- [81] de Sa, N. P. et al. Thiazole derivatives act on virulence factors of *Cryptococcus* spp. *Med. Mycol*. 57, 84–91 (2019).
- [82] Garcia-Santamarina S, Festa RA, Smith AD, et al. Genome-wide analysis of the regulation of Cu metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2018;108(5):473-494. doi:10.1111/mmi.13960

- [83] Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol.* 1982 Jun;150(3):1212-20.
- [84] Ding C, Festa RA, Chen YL, Espart A, Palacios Ò, Espín J, Capdevila M, Atrian S, Heitman J, Thiele DJ. *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. *Cell Host Microbe.* 2013 Mar 13;13(3):265-76
- [85] Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* 2010, 29, 2176–2179.
- [86] Seaton, P. J. & Williamson, R. T.; Mitra, A. & Assarpour, A. Synthesis of Quinolines and Their Characterization W by 2-D NMR Spectroscopy. *Journal of Chemical Education.* 2002, 79, 106-110.
- [87] Charlier C, Chrétien F, Baudrimont M, Mordelet E, Lortholary O, Dromer F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am J Pathol.* 2005;166(2):421-432.
- [88] Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C. A., Griffiths, E. J., Geddes, J. M., Hu, G., Jung, W. H., Kretschmer, M., Saikia, S., & Wang, J. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature reviews. Microbiology*, 9(3), 193–203.
- [89] Na Pombejra S, Salemi M, Phinney BS, Gelli A. The Metalloprotease, Mpr1, Engages AnnexinA2 to Promote the Transcytosis of Fungal Cells across the Blood-Brain Barrier. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Jun 30;7:296.
- [90] Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* 2000;68:443–448.
- [91] Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, Heitman J, Dromer F, Nielsen K. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* 2010 Jun 17;6(6):e1000953.
- [92] Zaragoza O, García-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* 2010 Jun 17;6(6):e1000945.
- [93] Kagan, S.; Ickowicz, D.; Shmuel, M.; Altschuler, Y.; Sionov, E.; Pitusi, M.; Weiss, A.; Farber, S.; Domb, A. J.; Polacheck, I. Toxicity Mechanisms of Amphotericin B and Its Neutralization by Conjugation with Arabinogalactan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012, 56 (11), 5603-5611.

- [94] Joaquim, A.R.; Gionbelli, M.P.; Gosmann, G.; Fuentefria, A.M.; Lopes, M.S.; Andrade, S.F. Novel Antimicrobial 8-Hydroxyquinoline-Based Agents: Current Development, Structure–Activity Relationships, and Perspectives. *J. Med. Chem.* 2021, 64, 16349–16379.
- [95] Salas, S.D.; Bennett, J.E.; Kwon-Chung, K.J.; et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 1996, 184 377–86.
- [96] Rosas, A.L.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A.; Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 2001, 69, 3410–2.
- [97] Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des., Dev. Ther.* 2013, 7, 1157-1178.
- [98] Schlicker, C. et al. Structure and Inhibition of the CO<sub>2</sub>-Sensing Carbonic Anhydrase Can2 from the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Molecular Biology* Vol 385, 2009, DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.037.
- [99] Annunziato, G. et al. Discovering a new class of antifungal agents that selectively inhibits microbial carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem.* Vol 33, 2018, DOI: 10.1080/14756366.2018.1516652.
- [100] Guzel, O. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. The  $\beta$ -carbonic anhydrases from the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* are strongly inhibited by substituted-phenyl-1H-indole-5-sulfonamides. *Bio & Med Chemistry Let.* Vol 20, 2010, DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.02.103.
- [101] Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL. New facets of antifungal therapy. *Virulence.* 2017 Feb 17;8(2):222-236.
- [102] You, Z.; Zhang, C.; Ran, Y. The effects of clioquinol in morphogenesis, cell membrane and ion homeostasis in *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 2020, 20, 165
- [103] Albrecht, M.; Fiege, M.; Osetska, O. 8-Hydroxyquinolines in metallosupramolecular chemistry. *Coord. Chem. Rev.* 2008, 252, 812-824.
- [104] Fuchs, F.; Hof, H.; Hofmann, S.; Kurzai, O.; Meis, J. F.; Hamprecht, A. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021, DOI: 10.1016/j.cmi.2021.06.035
- [105] Musiol, R.; Jampilek, J.; Nycz, J. E.; Pesko, M.; Carroll, J.; Kralova, K.; Vejsova, M.; O'Mahony, J.; Coffey, A.; Mrozek, A.; Polanski, J. Investigating the activity spectrum for ring-substituted 8- hydroxyquinolines. *Molecules* 2010, 15, 288-304.

[106] da Rocha, L. F.; Pippi, B.; Joaquim, A. R.; de Andrade, S. F.; Fuentefria, A. M. 8-hydroxyquinoline-5-(N-4-chlorophenyl) sulfonamide and fluconazole combination as a preventive strategy for *Candida* biofilm in haemodialysis devices. *J. Med. Microbiol.* 2021, 70, 70

[107] Bharti, S., K. et al. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol 45, 2010, DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.11.008

[108] Sá, N. P., Lima, C. M., A dos Santos, J. R., Costa, M. C., de Barros, P. P., Junqueira, J. C., Johann, S. (2018). A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. *Future Science OA*, 4(6), FSO305.

[109] Boateng, C.A. et al. Optimization of 3-(phenylthio)quinolinium compounds against opportunistic fungal pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol 46, 2011, DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.02.034.

[110] Reynolds, W. F.; Burns, D. C. Minimizing the risk of deducing wrong natural product structures from NMR data. *Analytical Science Journals*, 2019, Vol 59, 500 – 533.