



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CHARLLINE VLÁDIA SILVA DE MELO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E MECANISMO DE AÇÃO DE
ANÁLOGOS QUÍMICOS DA ISONIAZIDA FRENTE A *Coccidioides posadasii***

FORTALEZA- CE

2014

CHARLLINE VLÁDIA SILVA DE MELO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E MECANISMO DE AÇÃO DE ANÁLOGOS
QUÍMICOS DA ISONIAZIDA FRENTE A *Coccidioides posadasii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA-CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M485a Melo, Charlline Vlândia Silva de.
Atividade antifúngica *in vitro* e mecanismo de ação de análogos químicos da isoniazida frente a *Coccidioides posadasii* / Charlline Vlândia Silva de Melo. – 2014.
78 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Ciências Biológicas.
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.
1. Coccidioides. 2. Coccidioidomicose. 3. Isoniazida. 4. Teste de Sensibilidade Microbiana. I. Título.

CDD 616.96901

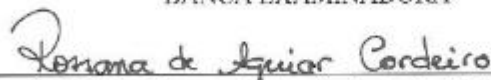
CHARLLINE VLÁDIA SILVA DE MELO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E MECANISMO DE AÇÃO DE ANÁLOGOS
QUÍMICOS DA ISONIAZIDA FRENTE À *Coccidioides posadasii*

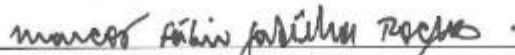
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Médica, da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em
Microbiologia Médica.

Aprovada em: 29 / 07/ 2014

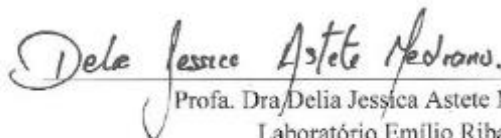
BANCA EXAMINADORA



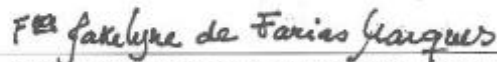
Prof.ª. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Co-orientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof.ª. Dra. Delia Jessica Astete Medrano
Laboratório Emilio Ribas



Prof.ª. Dra. Francisca Jakelyne de Farias Marques
Faculdade de Tecnologia Intensiva do Ceará (FATECI)

À minha tão amada família.

Aos meus pais Lenir e Francisco (*in memoriam*).

À minha irmã Eryka, meu irmão Max e meu sobrinho Bruno, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela oportunidade, paciência, orientação e dedicação durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela co-orientação, dedicação e apoio, participação como membro da banca e pelas considerações e sugestões que, com certeza, contribuirão na qualidade deste trabalho.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelo compromisso e disponibilidade nas atividades diárias do laboratório.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelos ensinamentos e contribuições à minha formação acadêmica.

A todos os professores e alunos do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Jair Mafezoli e à Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará, por todo auxílio necessário para síntese dos compostos químicos

À Profa. Dra. Francisca Jakelyne de Farias Marques, por toda paciência, dedicação e orientação durante todas as etapas necessárias para a realização desse trabalho, pelo apoio incondicional nas horas mais difíceis e pelas palavras de conforto ditas sempre que precisei.

Ao Dr. Marcos Reinaldo da Silva do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará, por todo empenho e trabalho laboral na síntese dos compostos químicos.

À doutoranda Rosana Serpa, por todo auxílio e orientação nas etapas finais do trabalho, de uma ajuda inigualável.

Aos companheiros de laboratório, pelas conversas, pela ajuda e pelo incentivo durante a realização desse trabalho, em especial a Eduardo Teixeira, Rita Amanda, Érica Pacheco e Jonathas Sales, pelos ensinamentos, mas o mais importante foi a amizade que se formou diante das dificuldades e hoje sei que posso assim chamá-los: amigos.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, Daniel Teixeira Lima e Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, pelo carinho, atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Coccidioidomicose é uma micose sistêmica que acomete o homem e outros animais domésticos e silvestres, causada pelo fungo dimórfico geofílico *Coccidioides posadasii*. Nos últimos anos, a melhoria dos métodos de diagnóstico micológico e o aumento da ocorrência de doenças imunossupressoras causaram grande impacto na incidência das micoses profundas e oportunistas no mundo. Apesar da existência de terapias antifúngicas eficazes contra a coccidioidomicose, a busca por novas drogas para o tratamento desta doença se faz necessária. O objetivo desse estudo foi determinar o efeito inibitório, *in vitro*, e o mecanismo de ação dos análogos químicos da isoniazida, isolados e em combinação com os antifúngicos anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITC), frente a cepas de *Coccidioides posadasii* (n=12). Para isso 12 cepas de *C. posadasii*, foram repicadas em ágar dextrose batata e utilizadas na realização dos testes de sensibilidade frente ao agente antituberculose isoniazida (INH) e seus análogos químicos. Os ensaios foram conduzidos por meio do teste de macrodiluição em caldo ou definição da concentração inibitória mínima (CIM) e o sinergismo foi avaliado pelo método do tabuleiro. Os análogos químicos inibiram o crescimento de todas as cepas de *C. posadasii* testadas isoladamente, com valores de CIM para cada composto que variaram de 100 a 400 µg/mL, para os análogos P3-[N⁷-(1-(4-metoxifeniletilden) isonicotinohidrazida] P5- [N⁷- (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida] e P6- [N⁷-(1-(4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida], de 25 a 100 µg/mL para a PACT- N⁷- (1-feniletilden) isonicotinohidrazida e de 0,0625 a 0,125 µg/mL para AMB e 0,125 a 0,5 µg/mL para ITC. Quanto a combinação entre as drogas antifúngicas e os análogos químicos da droga isoniazida, todos foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* das cepas de *C. posadasii*. Sinergismo foi detectado em 8 combinações não sendo observado nenhum antagonismo em nenhuma delas. Os análogos da isoniazida apresentaram valores de CIM de 2, 4, 8, 16, 32 vezes superior à atividade da droga antituberculose padrão. A extração dos esteróis e a permeabilidade da membrana fúngica foram averiguadas, respectivamente, por saponificação com aquecimento e por meio da leitura do sobrenadante da suspensão fúngica em comprimento de onda de 260 e 280 nm. Todos os compostos inibiram o crescimento *in vitro* das cepas de *C. posadasii*. Foi observado que os análogos da isoniazida isolados e em combinação com antifúngicos foram capazes de causar redução do teor de ergosterol celular; apenas os análogos P3 e P6 foram capazes de alterar a permeabilidade da membrana plasmática nas condições testadas. Em conclusão, os resultados mostram que os análogos derivados da isoniazida possuem atividade inibitória frente a *C. posadasii*.

Palavras-chave: Coccidioides. Coccidioidomicose. Isoniazida. Teste de Sensibilidade Microbiana

ABSTRACT

Coccidioidomycosis is a systemic mycosis that affects humans and domestic and wild animals, caused by the geophilic dimorphic fungus *Coccidioides posadasii*. In recent years, improvement in methods of mycological diagnosis and increased occurrence of immunosuppressive diseases caused great impact on the incidence of invasive and opportunistic mycoses in the world. Despite the existence of effective antifungal therapies against coccidioidomycosis, the search for new drugs to treat this disease is necessary. The aim of this study was to determine the *in vitro* inhibitory effect and the mechanism of action of chemical analogs of isoniazid, alone and in combination with the antifungals amphotericin B (AMB) and itraconazol (ITC), against of *C. posadasii* strains (n=12). For this, 12 *C. posadasii* strains were subcultured on potato dextrose agar and used in the the susceptibility tests against the antituberculosis agent isoniazid (INH) and its chemical analogues. The tests were conducted using the macrodilution broth test to set the minimum inhibitory concentration (MIC) and synergism was evaluated by the checkerboard method. The chemical analogs inhibited the growth of all tested strains of *C. posadasii*, with the MIC values for each compound ranging from 100 to 400 mg/mL for the analogs P3-[N'-(1-(4-methoxyfeniletildeno) isonicotinohydrazide], P5-[N'-(1-m-tolileilidene) isonicotinohydrazide] and P6- [N'-(1-(4-methylphenyl) ethylene) isonicotinohydrazide], 25 to 100 mg/mL for PACT- N'-(1-phenylethylidene) isonicotinohydrazide and 0.0625 to 0.125 mg/mL for AMB and from 0.125 to 0.5 mg/mL for ITC. When associating antituberculosis drugs with azoles derivatives, *in vitro* growth of the *C. posadasii* strains was inhibited. Synergism was observed for the eight combinations tested. Analogs of isoniazide presented MICs 2, 4, 8, 16 and 32-fold higher than the standard antituberculosis drug. The extraction of sterols and fungal membrane permeability were investigated, respectively, by saponification with heating and by reading the supernatant of the fungal suspension at wavelength of 260 to 280 nm. All compounds inhibited the *in vitro* growth of *C. posadasii* strains. It has been observed that the analogs of isoniazid, alone and in combination with antifungals, were capable of causing reduction in the level of cell ergosterol. Only the analogs P3 and P6 were capable of altering the plasma membrane permeability in the tested conditions. In conclusion, the results show that isoniazid analogs showed inhibitory activity against *C. posadasii*.

Keywords: *Coccidioides.Coccidioidomycosis. Isoniazid. Microbial Sensitivity Tests*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Macromorfologia de <i>Coccidioides</i> spp. (A), e micromorfologia de <i>Coccidioides</i> spp. (B). Aspecto morfológico na fase leveduriforme (C) e esférula madura com numerosos endósporos (D).	16
Figura 2 – Ciclo biológico de <i>Coccidioides</i> spp. demonstrando as conexões entre as fases filamentosa e parasitária.	18
Figura 3 – Visualização de esférulas de <i>Coccidioides posadasii</i> em órgãos de camundongos infectados experimentalmente.	19
Figura 4 – Estrutura da anfotericina B.	21
Figura 5 – Estrutura da membrana plasmática dos fungos (A), formação de poros pela interação entre a droga e o ergosterol da membrana celular (B)	22
Figura 6 – Estrutura química do itraconazol	24
Figura 7 – Estrutura fúngica e mecanismo de ação do itraconazol	25
Figura 8 – Estrutura química da droga antituberculose isoniazida.	27
Figura 9 – Estrutura geral de uma hidrazona.	28
Figura 10 – Estrutura química e fórmula molecular dos análogos químicos da droga isoniazida.	33
Figura 11 – Absorbâncias do conteúdo extracelular de células de <i>C. posadasii</i> (n=8) a 260nm (A) e 280nm (B) tratadas com os análogos da isoniazida	45
Figura 12 – Absorbâncias do conteúdo extracelular das células de <i>C. posadasii</i> (n=8) a 260nm (A) e 280nm (B) tratadas com os análogos da isoniazida	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipo de amostra, origem, identificação e localização geográfica dos isolados clínicos e ambientais de <i>C. posadasii</i> incluídos no estudo.....	32
Tabela 2 – Cetonas, hidrazonas, siglas e fórmula molecular dos análogos químicos da droga isoniazida empregados nessa pesquisa	33
Tabela 3 – Intervalos das concentrações dos análogos da isoniazida e antifúngicos testados isoladamente e em combinação frente a cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i> (n=12).....	35
Tabela 4 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) dos análogos da isoniazida e antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$) testados isoladamente frente às cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i> (n=12)	39
Tabela 5 – Variação dos valores e média geométrica de CIM e variação de FICI dos análogos da isoniazida combinados com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, em $\mu\text{g/mL}$, frente às cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i> (n=12).....	41
Tabela 6 – Concentração celular do ergosterol de cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i> (n=12) após exposição à hidrazonas, isoniazida e itraconazol.....	43
Tabela 7 – Concentração celular do ergosterol de cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i> (n=12) após exposição aos análogos da isoniazida em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol	44
Apêndice A – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para todas as cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo P3, isoniazida e itraconazol.....	69
Apêndice B – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para todas as cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo P5, isoniazida e itraconazol.....	70

Apêndice C – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para todas as cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo P6, isoniazida e itraconazol.....	71
Apêndice D – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para todas as cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo PACT, isoniazida e itraconazol.....	72
Apêndice E – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para oito cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo P3 combinado com os antifúngicos itraconazol e anfotericina B	73
Apêndice F – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para oito cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo P6 combinado com os antifúngicos itraconazol e anfotericina B	74
Apêndice G – Valores brutos das concentrações de ergosterol em μM para oito cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com o análogo PACT combinado com os antifúngicos itraconazol e anfotericina B.....	75
Apêndice H – Valores brutos da absorvância do conteúdo extracelular para todas as cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com os análogos P3, P5, P6 e PACT, isoniazida e anfotericina B	76
Apêndice I – Valores brutos da absorvância do conteúdo extracelular para todas as cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com os análogos P3, P5, P6 e PACT, isoniazida e anfotericina B	77
Apêndice J – Valores brutos da absorvância do conteúdo extracelular de oito cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com os análogos da isoniazida em combinação com o antifúngico anfotericina B	78
Apêndice K – Valores brutos da absorvância do conteúdo extracelular de oito cepas de <i>C. posadasii</i> tratadas com os análogos da isoniazida em combinação com o antifúngico anfotericina B	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFST-EUCAST	<i>Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
FLC	Fluconazol
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INH	Isoniazida
ITC	Itraconazol
KOH	Hidróxido de Potássio
P3	N ^o - (1- (4-netoxifeniletídeno) isonicotinohidrazida
P5	N ^o - (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida
P6	N ^o - (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida
PACT	N ^o - (1-feniletídeno) isonicotinohidrazida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Histórico da Coccidioidomicose	14
2.2 Agente etiológico	15
2.3 Epidemiologia	16
2.4 Patogenia e aspectos clínicos	17
2.5 Diagnóstico e tratamento	19
2.6 Drogas antifúngicas	21
2.6.1 Polienos	21
2.6.2 Derivados azólicos	23
2.7 Compostos antimicrobianas com potencial antifúngico	26
2.7.1 Isoniazida	26
2.7.2 Hidrazonas	27
3. HIPÓTESES	30
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo Geral	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Micro-organismos	31
5.2 Síntese dos análogos da droga isoniazida	32
5.3 Agentes Antimicrobianos	33
5.4 Atividade Antifúngica dos Análogos da Isoniazida	34
5.4.1 Inóculo fúngico	34
5.4.2 Teste de sensibilidade in vitro	34
5.4.2.1 Teste de macrodiluição em caldo – drogas isoladas	34
5.4.2.2 Teste de Checkerboard – sinergismo entre as drogas	36
5.5 Influência dos análogos da isoniazida sobre a concentração de ergosterol celular ..	36
5.6 Influência dos análogos da isoniazida sobre a integridade da membrana plasmática	37
5.7 Análise estatística	37
6. RESULTADOS	38
6.1 Sensibilidade de <i>C. posadasii</i> frente aos análogos isolados	38

6.2 Sensibilidade de <i>C. posadasii</i> frente aos análogos isolados em combinação com os antifúngicos.....	40
6.3 Determinação do efeito <i>in vitro</i> dos análogos da droga isoniazida frente ao teor de ergosterol celular isolados e combinados frente a cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i>	42
6.3.1 Análogos isolados	43
6.3.2 Análogos combinados	43
6.4 Determinação do efeito <i>in vitro</i> dos análogos da droga isoniazida sobre a integridade da membrana plasmática isolados e combinados frente a cepas clínicas e ambientais de <i>C. posadasii</i>	44
6.4.1 Análogos isolados	44
6.4.2 Análogos em combinados	46
8. DISCUSSÃO	48
9. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICES	71

1. INTRODUÇÃO

A coccidioidomicose é uma micose sistêmica causada pelos fungos dimórficos *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii*. Sua porta de entrada principal é a via respiratória, através da inalação de artroconídios formados por esses organismos durante a fase filamentosa, que estão presentes em solos contaminados. A coccidioidomicose é uma doença endêmica no continente americano, sendo amplamente distribuída na América do Sul. O Brasil obteve destaque pela ocorrência de surtos na forma pulmonar aguda da doença na região Nordeste. Desde então, tem se observado um aumento na ocorrência desta doença.

A coccidioidomicose representa um grande desafio terapêutico. O aumento do número de casos de micoses profundas e oportunistas, bem como casos de refratariedade ao tratamento e recidivas, são fatos preocupantes para a comunidade médica e científica. Com a finalidade de ampliar as opções de tratamento desta doença, a busca de novos alvos antifúngicos para a coccidioidomicose tem sido proposta através da combinação de antifúngicos, a descoberta de novas drogas antifúngicas e testes com antimicrobianos de amplo espectro com potencial antifúngico, como testes com drogas antituberculose.

Atualmente, a atividade *in vitro* de análogos da droga antituberculose isoniazida tem sido alvo de interesse na busca por novos compostos com possível ação antifúngica. Tais compostos vêm sendo avaliados isolados e combinados com drogas antifúngicas clássicas, como anfotericina B e itraconazol. A interação entre essas drogas pode representar uma alternativa viável para o tratamento de pacientes com coccidioidomicose. Contudo, a real importância desses agentes no tratamento de infecções fúngicas ainda requer estudos adicionais.

Com base nesse cenário o presente trabalho teve por objetivo uma investigação para busca de novas estratégias inibitórias contra *Coccidioides posadasii*. Baseando-se neste contexto, buscou-se avaliar o efeito inibitório *in vitro* e o mecanismo de ação dos análogos químicos sintetizados a partir da droga isoniazida (INH), associados ou não com anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITR), frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* isoladas no Nordeste brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Coccidioidomicose

Alejandro Posadas, em 1892, foi o primeiro a descrever o agente etiológico da coccidioidomicose, em Buenos Aires, Argentina. Posadas realizou um estudo histopatológico em um paciente que exibia lesões crônicas na pele e linfonodos (POSADAS, 1892). Em 1896, Rixford e Gilchrist descreveram o primeiro caso da doença na Califórnia, EUA, onde evidenciaram a presença de um micro-organismo semelhante ao descrito por Posadas, que apresentava células em formato arredondado, paredes grossas e variados tamanhos, que foram denominadas de esférulas (CORDEIRO et al., 2010). Desta forma, o micro-organismo foi posteriormente relacionado aos protozoários da classe Sporozoa, gênero *Coccidia*, sendo denominado de *Coccidioides immitis* (do latim: *Coccidioides* = *coccidium*; *immitis* = não leve) (ODDS, 2003a; RESTREPO, 2006).

Em 1905, Ophuls e Moffit, ao sementearem uma gota de pus de um paciente com coccidioidomicose em caldo nutritivo, descobriram que o micro-organismo tratava-se de um fungo e descreveram seu ciclo reprodutivo através da observação de filamentos fúngicos originários diretamente de endósporos liberados pelas esférulas (SAUBOLLE, 2007). Hirchs e Benson, em 1927, realizaram os primeiros estudos imunológicos da doença, através de testes com reações cutâneas utilizando extratos obtidos da fase filamentosa (DEUS FILHO, 2009). Em 1928, Ophus caracterizou a via respiratória como a principal forma de aquisição da infecção, afetando inicialmente os pulmões e, posteriormente, sujeita à disseminação (CASTAÑEDA-GODOY; LANIADO-LABORIN, 2002; MUÑOZ et al., 2004).

Stewart e Meyer, em 1932, obtiveram o primeiro isolamento ambiental do fungo em amostras de solo (STEWART; MEYER, 1932). Por volta de 1938, Dickson e Gifford denominaram a enfermidade de “coccidioidomicose” e descreveram as formas primárias e secundárias da doença (ELIAS-COSTA; NEGRONI; GIMENO, 1985). A partir da década de 40, a doença passou a ser também observada em animais, principalmente em cães, sendo relatada tanto em animais domésticos como em silvestres (SMITH et al., 1948).

Wanke et al. (1999) relataram a primeira microepidemia de coccidioidomicose no Brasil, ocorrida em 1991, também no Estado do Piauí, no município de Oeiras, envolvendo três caçadores de tatus e oito cães com quadro respiratório agudo. Amostras de solo do local onde foi praticada a caça aos tatus confirmaram o fato através do isolamento de *C. posadasii*. (WANKE et al., 1999). Do mesmo modo, Sidrim et al. (1997) e Silva et al. (1997) relataram

uma microepidemia ocorrida em 1995 no município de Aiuaba, interior do Estado do Ceará. Cerca de quatro casos foram relatados, envolvendo caçadores de tatu (SIDRIM et al., 1997; SILVA et al., 1997).

Desde então, já foram descritos vários novos casos da doença no estado do Ceará, procedente dos municípios de Boa Viagem, Solonópoles, Catunda, Santa Quitéria, Arneiroz, Ibiapina, Sobral, Jaguaribe e Parambu (CORDEIRO et al., 2010), destacando, assim, o Nordeste no cenário epidemiológico da coccidioidomicose.

2.2 Agente etiológico

A coccidioidomicose possui como agentes etiológicos os fungos dimórficos térmicos do gênero *Coccidioides*, sendo representado por duas espécies: *C. immitis* e *C. posadasii* (FISHER et al., 2002). Taxonomicamente, pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae (FISHER et al., 2002). São caracterizados como micro-organismos geofílicos, cujo habitat primário corresponde a ambientes semiáridos e desérticos, com temperatura média acima de 30 °C e solos com elevada salinidade e pH alcalino, com profundidades que podem variar entre 5 e 30 cm da superfície do solo (COX; MAGEE, 2004). Apesar das diferenças genéticas entre as espécies, ambas causam infecção em humanos e animais e não apresentam diferença quanto às manifestações clínicas e resposta imune do hospedeiro (AMPEL, 2009).

O gênero *Coccidioides* pode apresentar-se em duas fases: saprofítica e parasitária (DEUS FILHO, 2009). Na fase saprofítica, encontra-se sob a forma filamentosa, em temperaturas em torno de 25 °C, sendo esta a forma infectante de seu ciclo biológico (COX; MAGEE, 2004; SABOULLE et al., 2007). Na macromorfologia, as espécies são caracterizadas por um micélio vegetativo com colônias esbranquiçadas de aspecto algodinoso (DEUS FILHO, 2009). (Figura 1A). Microscopicamente, mostram-se como hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas, que originam artroconídios intercalados por células estéreis, denominadas disjuntoras (DE HOOG et al., 2001) (Figura 1B). Na fase parasitária, nos tecidos do hospedeiro à temperatura de 37 °C, os artroconídios sofrem conversão para a forma leveduriforme (Figura 1C), a qual é caracterizada pela formação de grandes estruturas arredondadas de paredes espessas, denominadas esférulas (Figura 1D), as quais são divididas internamente dando origem a centenas de endósporos uninucleados (SAUBOLLE, 2007).

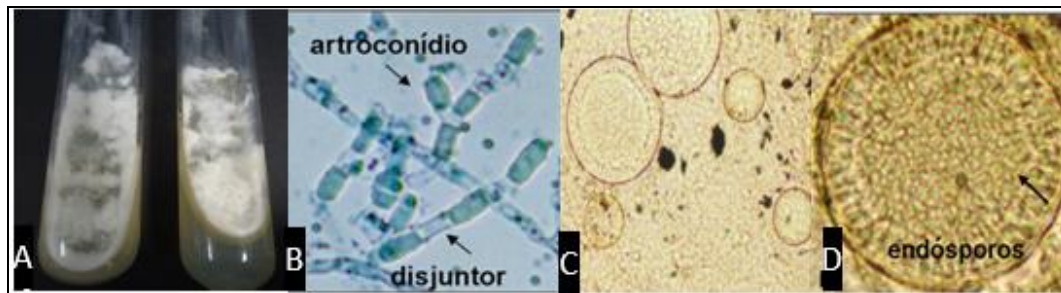


Figura 1 – Macromorfologia de *Coccidioides posadasii*. em ágar batata dextrose, mostrando colônias brancas com textura algodoadosa (A), e micromorfologia de *Coccidioides* spp. revelando hifas maduras contendo artroconídios, espaçados por células disjuntoras (B). Aspecto morfológico na fase leveduriforme (C) e esférula madura com numerosos endósporos (D). Fonte: CEMM (2011, 2014).

2.3 Epidemiologia

A coccidioidomicose é endêmica no continente americano, sendo restrita a uma faixa delimitada entre 40° N 120° W no norte da Califórnia e 40° S 65° W, no sul da Argentina (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2004; RIQUELME, 2007 LANIADO-LABORÍN, 2007). A definição de áreas endêmicas baseia-se na identificação de casos em humanos e animais, de modo que uma grande variedade de animais é suscetível a coccidioidomicose, sendo o cão considerado o melhor marcador epidemiológico desta micose (AMPEL, 2009).

Os aspectos epidemiológicos conferem um auxílio à distinção de ambas as espécies. *C. immitis* encontra-se restrito ao Vale de San Joaquin, na Califórnia, Estados Unidos da América, sendo conhecido como linhagem “californiana”. *C. posadasii* é conhecido como linhagem “não-californiana”, apresentando uma distribuição mais ampla, abrangendo outros locais dos Estados Unidos da América e outros países como México, Honduras, Venezuela, Argentina, Guatemala, Paraguai e Brasil (FISHER et al., 2001, 2002; LANIADO-LABORÍN, 2007). O Brasil foi incluído no mapa da distribuição geográfica da coccidioidomicose após o relato dos primeiros surtos da forma pulmonar aguda que ocorreram no Piauí e Ceará. Desde então, o número de casos tem crescido constantemente (BRILHANTE et al., 2008).

O Estado do Ceará possui relatos de casos de coccidioidomicose relacionados às caçadas de tatu, animal bastante apreciado como alimento na região. Os caçadores, ao escavarem o solo a procura do animal, ficam expostos à forma infectante do fungo através da inalação dos artroconídios da fase saprofítica (PEREIRA JÚNIOR; JORGE; BAGAGLI, 2003; CORDEIRO et al., 2006a). As tocas de outros animais também podem estar

relacionadas com a epidemiologia da doença, sendo verificados alguns casos associados ao contato com tocas de roedores nos Estados Unidos (DRUTZ; CATANZARO, 1978). Fenômenos naturais como furacões, terremotos e fortes ventanias também podem estar associados ao acontecimento de casos da doença (RESTREPO, 2006).

2.4 Patogenia e aspectos clínicos

As espécies de *Coccidioides* são consideradas patógenos primários, uma vez que são capazes de estabelecer doença em hospedeiros imunocompetentes e imunodeprimidos (EULÁLIO et al., 2000; COSTA et al., 2001). Dentre os fatores de virulência relatados em *Coccidioides* spp. tem destaque o antígeno imunodominante SOWgp, presente na parede celular do fungo na fase leveduriforme, o qual é capaz de direcionar a resposta imune através da via Th2, oferecendo uma vantagem ao patógeno por gerar o comprometimento da imunidade celular (HUNG; XUE; COLE, 2007).

Ainda, outros fatores de virulência são observados, como: a produção de urease, que promove a alcalinização do meio e causa dano tecidual no hospedeiro; a produção de proteases, relacionadas à lise de colágeno, além da clivagem de imunoglobulinas como IgA e IgG; e a produção de melanina, capaz de reduzir a sensibilidade do fungo a drogas antifúngicas e aumentar a resistência aos mecanismos de defesa imune (HUNG et al., 2002; MIRBORD-DONOVAN et al., 2006).

A principal via de contaminação da coccidioidomicose é por inalação de artroconídios na fase filamentosa de *Coccidioides* spp., os quais se dispersam facilmente no ar (CORDEIRO et al., 2010). No solo, os artroconídios são liberados após autólise das células disjuntoras e podem seguir por dois caminhos: germinar e perpetuar o ciclo sapróbio ou serem inalados por um hospedeiro suscetível e iniciar o ciclo parasitário (LANIADO-LABORÍN, 2006). Nos alvéolos pulmonares, os artroconídios sofrem mudanças em sua morfologia e tornam-se esférulas com minúsculos endósporos em seu interior (CORDEIRO et al., 2012). Estas esférulas, quando maduras, sofrem ruptura, liberando os endósporos. Assim, cada um dos endósporos atua como um novo agente infectante, se diferenciando em uma nova esférula, que é novamente capaz de produzir de 200-300 endósporos, reiniciando o ciclo parasitário (Figura 2) (HUNG; XUE; COLE 2007).

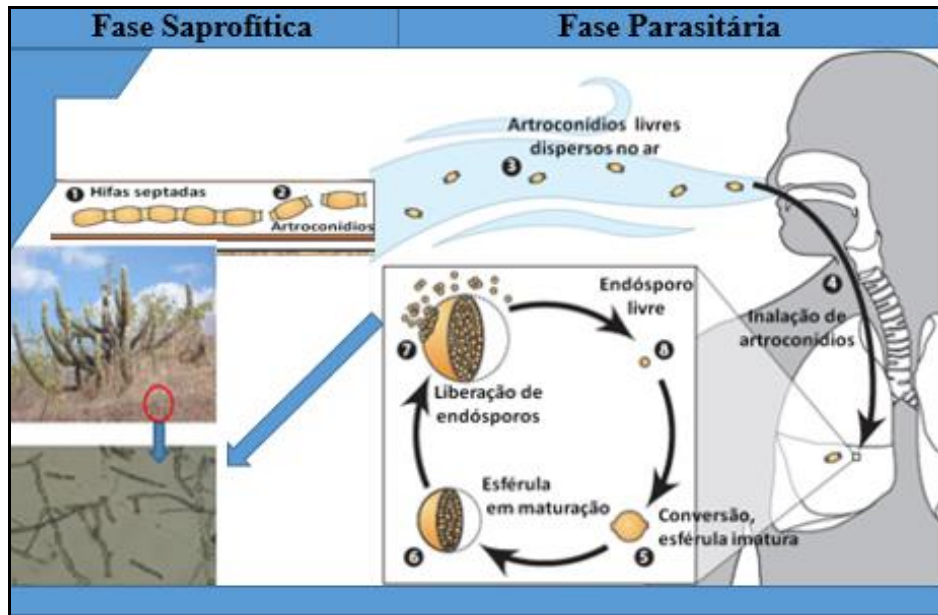


Figura 2 – Ciclo biológico de *Coccidioides* spp. demonstrando as conexões entre as fases filamentosas (Saprofítica) e parasitária. Fonte: SILVA (2010), com adaptações.

A coccidioidomicose se define como uma doença crônica de comprometimento pulmonar progressivo, podendo haver disseminação para diversos sítios anatômicos. Seus sinais e sintomas são inespecíficos, podendo simular quadros de viroses respiratórias e tuberculose (COX; MAGEE, 2004). Assim, a coccidioidomicose pode ser classificada em: forma pulmonar primária, forma pulmonar progressiva e forma disseminada (DEUS-FILHO, 2009).

A forma pulmonar primária acomete as vias respiratórias, simulando desde estados transitórios, como resfriados ou gripes, a quadros pneumônicos radiologicamente indistintos de pneumonia bacteriana (COX; MAGEE, 2004). A infecção pulmonar progressiva apresenta semelhanças clínicas, radiográficas e histopatológicas com várias manifestações respiratórias agudas ou crônicas, como, por exemplo, a tuberculose pulmonar na fase aguda, devendo, portanto, ser estabelecido diagnóstico diferencial (CASTAÑEDA-GODOY; LANIADO-LABORIN, 2002). A forma disseminada pode ocorrer entre 1 a 5% dos indivíduos infectados, afetando especialmente hospedeiros imunocomprometidos (GALGANI et al., 1995, 1999; AGUILAR et al., 2001; BLAIR et al., 2008; FISHER et al., 2010; PFALLER; DIEKEMA, 2010). Por fim, a forma cutânea primária pode ocorrer após a inoculação traumática de estruturas fúngicas, sendo relatada em acidentes laboratoriais, e cujas manifestações incluem a presença de nódulos e placas verrucosas, pápulas, formação de abscessos e úlceras no local (NOOR et al., 2008).

2.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da coccidioidomicose é determinado através da análise dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (CORDEIRO et al., 2012). Na atualidade, as técnicas micológicas, histopatológicas, imunológicas e moleculares são largamente utilizadas no diagnóstico da infecção (BLAIR et al., 2006; ROSSINI; GOULART, 2006).

O diagnóstico micológico de *Coccidioides* spp. é realizado inicialmente através do exame direto (Figura 3), que consiste na visualização de amostras clínicas preparadas em montagem do tipo lâmina-lamínula, sendo observadas ao microscópio óptico, a fim de detectar estruturas parasitárias do fungo, como esférulas em diferentes estágios de maturação e numerosos endósporos no seu interior (ROCHA; SIDRIM, 2004). O hidróxido de potássio é usado no exame direto como um método rápido e facilmente disponível. Os espécimes clínicos mais utilizados são secreções respiratórias, como escarro, aspirado traqueal e lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano, aspirados de lesões ósseo-articulares, líquido pleural, biopsias de pele e tecido pulmonar (SUTTON, 2007).

O exame histopatológico é realizado a partir de tecidos ou líquidos de biópsias de lesão tegumentar, pulmonar e de outros materiais suspeitos e em necropsia (LACAZ et al., 2002). Em amostras positivas, são visualizadas esférulas em diferentes estágios de maturação, com endósporos em seu interior (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007). Nos testes histopatológicos, faz-se uso de colorações próprias para fungos, tais como Gomori-Grocott e ácido periódico de Schiff (PAS). Outras colorações, como hematoxilina-eosina (HE) e Giemsa também têm sido utilizadas (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007).

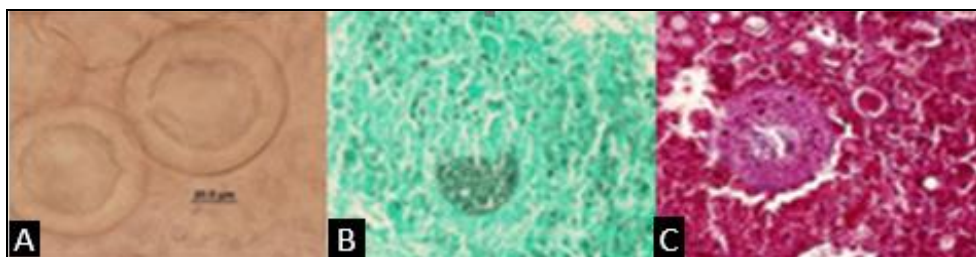


Figura 3 – Visualização de esférulas de *Coccidioides posadasii* em órgãos de camundongos infectados experimentalmente. Preparação tipo lâmina-lamínula com KOH 10% (3A) mostrando esférulas em processo de maturação, mostrando grande vacúolo central, esférula madura liberando endósporos, esférulas maduras repletas de endósporos em preparados histológicos corados por Grocott-Gomori (3B) e PAS (3C). Fonte: CEMM (2011).

As técnicas imunológicas apresentam diferentes níveis de sensibilidade e especificidade, além de revelarem informações importantes sobre a epidemiologia da doença

(WHEAT, 2009; AMPEL et al., 2009; CORDEIRO et al., 2009). Essas técnicas são consideradas ferramentas auxiliares no diagnóstico da coccidiodomicose (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007). Atualmente os principais testes utilizados incluem ensaios imunoenzimáticos (EIA), imunodifusão (IMDF) e fixação do complemento (CF) (SABOULLE, 2007).

Quanto às técnicas moleculares de diagnóstico, grande parte baseia-se em reações de PCR com *primers* específicos. O rDNA é comumente alvo desses *primers*, uma vez que centenas de cópias dessa região estão presentes no genoma, o que garante uma elevada sensibilidade (GREENE et al., 2000; LINDLEY et al., 2001). Outras regiões também têm sido exploradas com sucesso, a exemplo da sequência de nucleotídeos do *locus* do *antigen2/proline rich*, antígeno específico de *Coccidioides* spp. utilizados em técnicas como *nested* PCR e PCR em tempo real (BIALEK et al., 2004). É válido ressaltar que a identificação molecular da coccidiodomicose ainda funciona como complemento ao diagnóstico laboratorial (BRILHANTE et al., 2010).

O tratamento da coccidiodomicose a ser aplicado depende da forma clínica apresentada pelo paciente. No caso de infecções pulmonares localizadas e sem risco de complicações, na maioria das vezes é preciso apenas de uma reavaliação periódica para verificar a resolução espontânea da infecção. No entanto, quando se trata de um quadro de disseminação com riscos de complicações devido à imunossupressão, a exigência é maior com relação ao tratamento, incluindo terapia com drogas antifúngicas e/ou intervenção cirúrgica, com duração de meses a anos, ou mesmo ao longo da vida supressiva do paciente, quando necessário (GALGIANI et al., 2005).

As principais drogas antifúngicas utilizadas são a anfotericina B, voltada para os casos graves da doença, e derivados azólicos como, itraconazol e fluconazol, usados principalmente nas manifestações leves ou moderadas (DICAUDO, 2006). De acordo com o Ministério da Saúde (2008), o tratamento recomendado para coccidiodomicose é uma dose total de 1 a 3 g de anfotericina B, seguido da aplicação de 400 mg/dia de fluconazol ou 300 mg/dia de itraconazol por um período de 6 a 12 meses.

Atualmente, existem novas drogas antifúngicas que podem trazer benefícios para o tratamento da coccidiodomicose. Os triazólicos voriconazol e posaconazol têm mostrado resultados eficazes em alguns casos da doença, principalmente com relação a infecções refratárias (PROIA; TENORIO, 2004; STEVENS et al., 2007). No grupo das equinocandinas, vale destacar a caspofungina, micafungina e anidulafungina. Apenas a caspofungina possui uso clínico autorizado, mostrando excelente ação terapêutica em estudo com

coccidioidomicose experimental em modelos murinos (GONZALEZ et al., 2001) e no tratamento de um paciente que apresentava um quadro de disseminação da doença (ANTONY, 2004).

2.6 Drogas antifúngicas

2.6.1 Polienos

A anfotericina B (AMB), produzida pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, foi inicialmente isolada em meados de 1955 e no final dos anos 50 já era utilizada em alguns casos clínicos (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Em 1965, foi o primeiro composto antifúngico a ser aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (FIANCHI et al., 2007; PETRIKKOS; SKIADA, 2007). Mesmo com a sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980, a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a anfotericina B permaneça como fármaco de primeira escolha para o tratamento das principais micoses profundas e sistêmicas tais como a coccidioidomicose e histoplasmose (LEDTKE et al., 2012), a paracoccidioidomicose e a blastomicose (LÓPEZ-MARTÍNEZ; MÉNDÉZ-TOVAR, 2012).

A anfotericina B é caracterizada por uma estrutura química macrocíclica formada por 37 carbonos, sete ligações duplas conjugadas e uma micosamina (3-amino-3,6-didesoximanose) ligada a um anel principal (Figura 4) (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

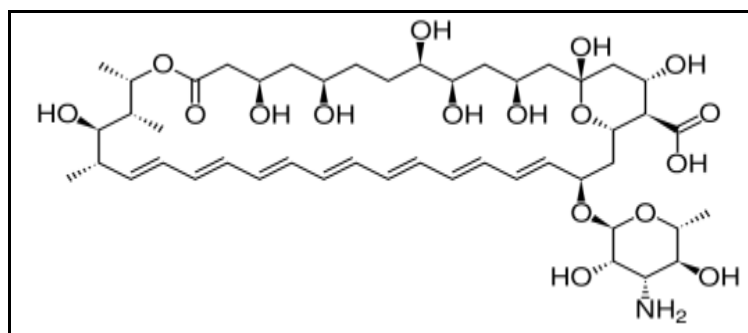


Figura 4 – Estrutura da anfotericina B. Fonte: Filippin e Souza (2006).

Os polienos atuam na membrana plasmática dos fungos, interagindo com o ergosterol presente na membrana (Figura 5A) (VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Essa interação resulta na formação de poros na membrana, o que leva à perda de eletrólitos

importantes, bem como outros componentes citoplasmáticos e também permite a entrada excessiva de água. (Figura 5B). No entanto, o ergosterol das células fúngicas e o colesterol nas células animais possuem semelhanças moleculares, o que resulta em uma precária capacidade da droga em diferenciá-los (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

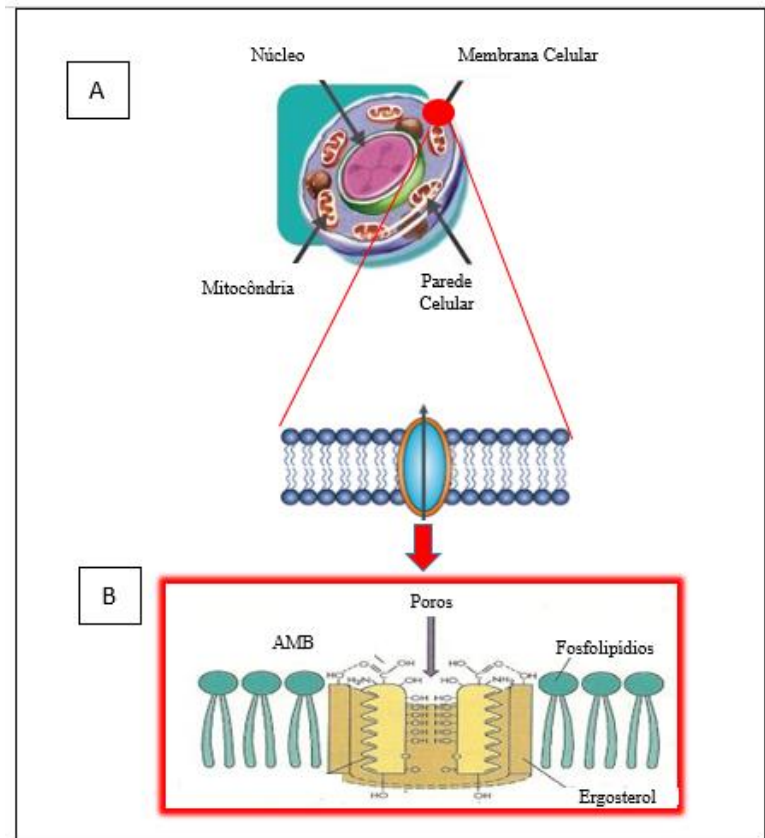


Figura 5 – Estrutura da membrana plasmática dos fungos (A), Formação de poros pela interação entre a droga e o ergosterol da membrana celular (B), Adaptado de MARQUES, 2009.

A atividade *in vitro* da anfotericina B abrange uma grande variedade de espécies, sendo eficaz contra diferentes leveduras como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., e contra os dimórficos *Coccidioides* spp., *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *Sporothrix* spp. Apresenta atividade também contra outros gêneros de fungos, como *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp., entre outros. Quanto a sua atividade *in vivo*, a AMB possui um comportamento ora fungistático ora fungicida, dependendo da sensibilidade do fungo ou da concentração encontrada no sítio da infecção (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Devido à nefrotoxicidade e algumas reações adversas causadas por AMB durante o tratamento, diferentes formulações da droga foram desenvolvidas com o objetivo de diminuir sua toxicidade sem alterar a eficácia, possuindo menor afinidade ao colesterol e o mesmo

mecanismo de ação eficiente. São elas: complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet®, The Liposome Company Inc., Princeton, NJ, Reino Unido); anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil®, Sequuspharmaceuticals Inc., Menlo Park, CA, EUA); e anfotericina B lipossomal (AmBisome®, Fujisawa Healthcare Inc., Deerfield, IL, EUA). Todas foram aprovadas na década de 90 pela *Food and Drug Administration* (FDA) (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Diversos autores relatam o sinergismo presente na associação de AMB e 5-fluorocitosina na maioria dos casos, sendo normalmente indicada para o tratamento de criptococose e aspergilose (JOHNSON et al., 2004). Estudos realizados por Medrano (2010) verificaram a ação sinérgica do azólico voriconazol com anfotericina B *in vitro* frente às cepas de *C. posadasii*, necessitando a realização de futuros ensaios clínicos controlados a fim de definir a segurança e utilidade desta combinação na terapia antifúngica.

2.6.2 Derivados azólicos

Os derivados azólicos surgiram a partir da década de 60, com a descoberta do benzimidazol por Wooley em 1944 (ZHANG, 2005). Em seguida, a indústria farmacêutica se dedicou à produção de novos derivados imidazóis tais como: clotrimazol (1969, Bayer, Alemanha), miconazol (1969, Janssen, Bélgica), econazol (1975, Janssen, Bélgica), isoconazol (1979, Schering, Alemanha), tioconazol (1979, Pfizer, Reino Unido) e oxiconazol (1979, Roche, Suíça), sendo todos utilizados por via tópica, com exceção do miconazol que possuía administração parenteral, no entanto, com elevados índices de toxicidade (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Em 1979, a indústria farmacêutica Janssen (Bélgica) lançou no mercado o cetoconazol, o primeiro derivado imidazol oral para uso clínico (MARTINEZ, 2006). Em 1982, o laboratório Pfizer (Reino Unido) sintetizou o fluconazol, o primeiro derivado triazólico, sendo relativamente mais eficaz do que os derivados imidazóis por sua administração sistêmica, maior biodisponibilidade e menor toxicidade se comparado ao cetoconazol. Com os avanços das pesquisas, foram surgindo novos derivados triazóis, tais como o itraconazol (1983) e saperconazol (1988 Janssen, Bélgica) e os mais recentes voriconazol, posaconazol, ravuconazol e albaconazol (SILVA, 2010).

Os derivados azólicos são antifúngicos sintéticos caracterizados por possuírem um anel pentagonal na sua estrutura, formado por dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbono (imidazólicos) ou três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono (triazólicos),

unido ao restante da molécula através da ligação C-N (CATALÁN; MONTEJO, 2006) (Figura 6).

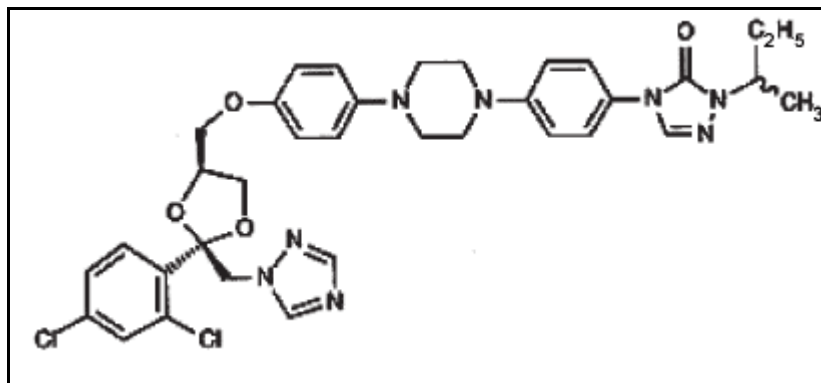


Figura 6 – Estrutura química do itraconazol. Fonte: MARQUES, 2009.

O mecanismo de ação dos azólicos, assim como a AMB, tem como alvo a molécula de ergosterol (CAZEDEY et al., 2007), um componente vital da membrana celular dos fungos, cuja função é regular a fluidez da membrana, conferindo-lhe estabilidade, assimetria e integridade (CARRILO-MUÑOZ et al., 2007) (Figura 6).

O modo de ação dessas drogas consiste no bloqueio da biossíntese do ergosterol, agindo sobre as enzimas do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP2C9) da célula fúngica, que transforma o lanosterol em ergosterol (CAZEDEY et al., 2007) (Figura 7). A diminuição da concentração de ergosterol altera a fluidez da membrana e aumenta a permeabilidade, promovendo ação fungicida ou fungistática por perda eletrolítica, dependente da concentração do antifúngico administrado. Acredita-se que os mecanismos de resistência aos derivados azólicos incluem alteração ou aumento da expressão da enzima 1,4 α -demetilase, alteração da via da síntese do ergosterol, diminuição da concentração intracelular da droga por mecanismo de bomba de efluxo e, por fim, a secreção de enzimas capazes de degradar a droga (MARTINEZ, 2006).

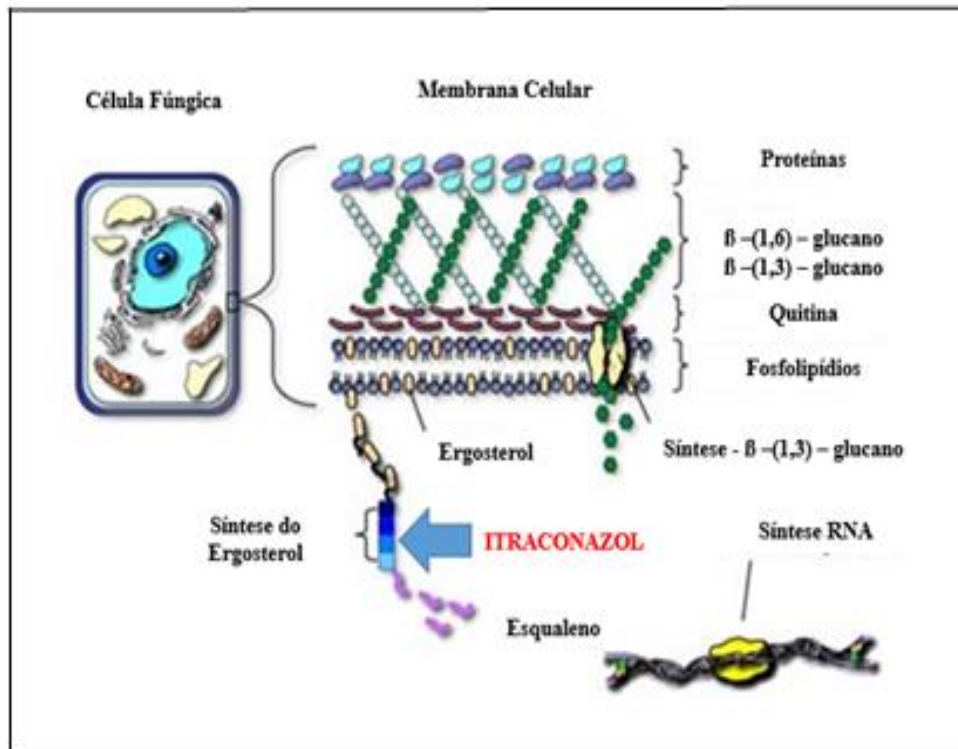


Figura 7 – Estrutura da célula fúngica e mecanismo de ação do itraconazol.
Fonte: www.doctorfungos.org.

Os azólicos, de uma maneira geral, possuem um amplo espectro de ação, incluindo os agentes das principais infecções fúngicas sistêmicas *Coccidioides* spp., *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, bem como *C. neoformans* e a maioria das espécies de *Candida*, sendo que *C. krusei* e *C. glabrata* são menos sensíveis (MARTINEZ, 2006).

Os novos azólicos voriconazol, ravuconazol e posaconazol apresentam atividade *in vitro* contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., incluindo os isolados resistentes aos triazólicos de primeira geração (GREER, 2007), além das espécies filamentosas *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. terreus* e os fungos dimórficos *B. dermatitidis*, *C. immitis*, e *H. capsulatum* (GONZÁLEZ, 2009). Quanto a sua atividade *in vivo*, o itraconazol é empregado no tratamento da aspergilose, cromomicose, micoses superficiais como candidíase oral, dermatofitose e pitiríase versicolor (CAZEDEY et al., 2007).

Várias classes de drogas interagem com os azólicos, ora reduzindo os níveis séricos do antifúngico, ora elevando os níveis de outros fármacos (BENNETT, 2006; KAUFFMAN, 2006b).

2.7 Compostos antimicrobianas com potencial antifúngico

O termo “drogas não-antifúngicas”, introduzido por Afeltra e Verweij, deu origem a um grupo de compostos que são empregados na terapia de doenças de etiologia não-antifúngica, mas que podem possuir um amplo espectro de ação nas micoses (AFELTRA; VERWEIJ, 2003). Esse grupo de compostos está sendo testado na pesquisa científica com a finalidade de observar a capacidade de apresentar atividade antifúngica (CAMPOS, 2007). Nas últimas décadas, a descoberta e o uso de novas drogas antibacterianas foi capaz de aumentar consideravelmente a sobrevivência dos pacientes. Entretanto, o uso constante e/ou inadequado desses fármacos ocasionou um aumento na incidência de micoses nestes pacientes, sejam estas superficiais ou sistêmicas (LACAZ, 2002; POLAK, 1990; ALVES et al., 2001; NOBRE et al., 2002).

Contudo, a busca por novas drogas para o tratamento da coccidioidomicose impulsionou este trabalho a avaliar, pela primeira vez, a atividade inibitória *in vitro* de análogos químicos da droga isoniazida frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii*, utilizando o método de análise por determinação da concentração inibitória mínima por macrodiluição em caldo. A isoniazida é o fármaco de “primeira escolha” para a terapia da tuberculose (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Essa droga combina elevado nível de eficiência nas doses recomendadas, a toxicidade é baixa, mas em caso de superdosagem, alcoolismo e gravidez, podem alterar essa toxicidade, uma vez que dessa droga age no sistema enzimático das microbactérias ou bloqueando sua síntese protéica (CAMPOS, 2007).

2.7.1 Isoniazida

A isoniazida é uma hidrazida do ácido isonicotínico (Figura 8) (MARQUES 2009) e trata-se de um metabólito ativo muito eficiente no tratamento da tuberculose (FERREIRA et al., 2007). Sua ação antimicrobiana foi relatada em 1945 por Chorine, que descreveu a atividade tuberculostática da nicotinamida em modelos animais (ZHANG, 2005), sendo a isoniazida desenvolvida em 1952 (FERREIRA; NOGUEIRA; SOUZA, 2007).

Mesmo considera uma molécula de estrutura química bem simples, seu mecanismo de ação ainda é bastante complexo e consiste na inibição da síntese dos ácidos micólicos do *M. tuberculosis* (MARQUES, 2009). A isoniazida é considerada um pró-fármaco (bioprecursor) que é ativado *in vivo* pela enzima KatG, uma catalase-peroxidase

micobacteriana (ZHANG et al., 1992) para gerar a forma ativa (ânion ou radical) que se liga covalentemente ao átomo de carbono na posição 4 do anel nicotinamida do cofator NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), dando origem a um aduto no sítio ativo da enzima *InhA*, inativando-a. Como consequência, ocorre a interrupção da biossíntese dos ácidos micólicos, considerados os principais constituintes da parede celular do *M. tuberculosis* (KREMER et al., 2003).

Sua atividade antibacteriana limita-se às microbactérias. Porém estudos anteriores demonstram que esta droga apresenta atividade antifúngica *in vitro* relevante frente aos fungos dimórficos *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006b) e *H. capsulatum* (MARQUES, 2013).

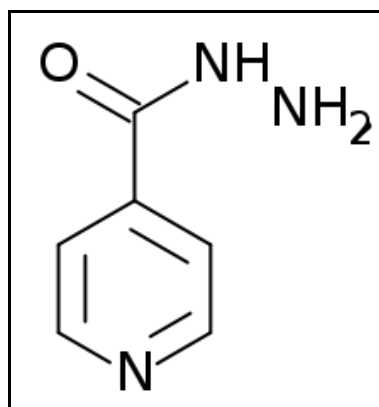


Figura 8 – Estrutura química da droga isoniazida.
Fonte: MARQUES, 2009.

2.7.2 Hidrazonas

Encontrar novas drogas representa um grande desafio para pesquisadores. Espera-se que os novos agentes possam reduzir a duração total do tratamento (ORME et al., 2001), serem compatíveis com os fármacos já existentes, apresentar uma ação sinérgica e, quando possível, não interferir com outros medicamentos (ZHANG, 2005).

Hidrazonas (Figura 9) são compostos do tipo base de Schiff e podem formar derivados diversos pela simples adição dos grupos radicais (R) das moléculas, sendo preparados a partir de hidrazidas unidas a cetonas e aldeídos através de reações de condensação (MARQUES, 2009).

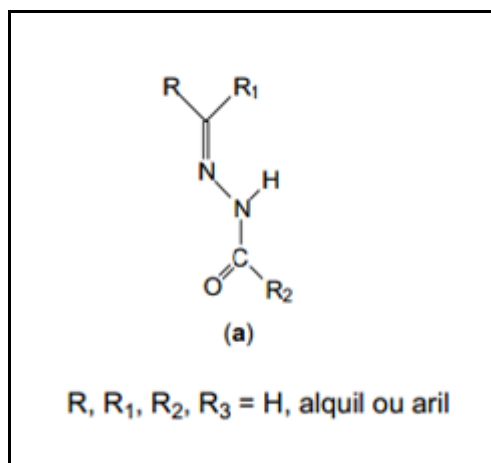


Figura 9 – Estrutura geral de uma hidrazona. Fonte: Beraldo (2004).

As hidrazonas derivadas de compostos acil apresentam um sítio doador C=O. A presença deste sítio adicional as torna mais versáteis devido ao seu grande potencial quelante, o qual tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (RAHMAN et al., 2005). Desta forma, uma grande variedade de complexos tem sido sintetizada a partir dessas hidrazonas, onde se observa que a coordenação ocorre através das formas neutra ou aniônica, como ligante bi- ou tridentados (BAKIR et al., 2008). No último caso, a presença de um anel heteroaromático nos grupos R1 ou R2 fornece um sítio de coordenação adicional.

A atividade antibacteriana das hidrazonas é conhecida há bastante tempo (RAHMAN et al., 2005). Um quelato complexo lipossolúvel de cobre facilitador da internalização de células foi desenvolvido com a isoniazida, formando um composto de primeira linha mais efetivo (PATOLE et al., 2003).

Muitas substâncias que pertencem ao grupo das hidrazonas têm sido descritas na literatura como inibidores das enzimas ciclo-oxigenase (COX) e 5-Lipo-oxigenase (5-LO), apresentando atividades analgésica e anti-inflamatória. Pesquisas demonstram que o grupamento hidrazona, presente em derivados fenil-hidrazonas e compostos aril e acil-hidrazonas, apresentam caráter farmacofórico para a inibição de COX e pronunciada atividades analgésica e anti-inflamatória, além de outras atividades, como anticonvulsivante e antimicrobiana (TODESCHINI et al., 1998; REIS et al., 2011).

Judge et al. (2009) estudaram o potencial antibacteriano, antifúngico, antimicobacteriano e antiviral de uma série de hidrazonas provenientes da isoniazida. Esses compostos foram testados frente a isolados de *C. albicans* e *A. niger*, mostrando resultados

relevantes na inibição destas espécies fúngicas. Visbal et al. (2011) demonstraram a atividade inibitória *in vitro* de quatro análogos de hidrazona ante ao fungo dimórfico *P. brasiliensis*.

Recentemente, Cordeiro et al. (2014) demonstraram a atividade antifúngica e ação sobre o teor de ergosterol e permeabilidade da membrana plasmática do análogo da isoniazida N¹-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida, isolado e em combinação com drogas antifúngicas anfotericina B e itraconazol, frente a *H. capsulatum*, tanto na forma filamentosa quanto na forma leveduriforme.

Nesse contexto, os análogos da isoniazida utilizados na pesquisa frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* foram os seguintes: P3-[N¹ (1-metoxifeniletilideno)]; P5-[N¹- (1-m-tolileilidene)]; P6- [N¹-(1-(4-metilfenil)etilideno) e PACT- N¹- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida, sintetizados a partir da reação entre a droga isoniazida e diferentes cetonas, conforme descrito por (CORDEIRO et al., 2014).

O motivo que nos leva a escolha dos compostos sintetizados a partir da isoniazida dá-se em virtude de estudos anteriores já descritos da ação *in vitro* da droga isoniazida frente a cepas de *C. posadasii*, com resultados promissores. Em virtude da coccidioidomicose tratar-se de doença, em muitos casos, assintomática ou com sintomas compatíveis com tuberculose, e uma vez que a isoniazida é droga de primeira escolha no tratamento de tuberculose (MARQUES, 2009).

Como já descrito por Cordeiro et al. (2006), a droga isoniazida foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de cepas de *C. posadasii*, sugerindo testar se os análogos da droga isoniazida possuem a mesma capacidade de inibição frente essas cepas, por modificações em suas estruturas química, o que embasou o presente estudo a testar a atividade *in vitro*, e sugerir possíveis mecanismo de ação de quatro compostos derivados da isoniazida frente a doze cepas clinicas e ambientais de *C. posadasii*.

3. HIPÓTESES

1. *C. posadasii* é sensível, *in vitro*, aos análogos químicos da droga isoniazida.
2. Os análogos da isoniazida apresentam interação sinérgica em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol frente a *C. posadasii*
3. Os análogos químicos da isoniazida são capazes de reduzir os níveis de ergosterol celular e alterar a permeabilidade da membrana plasmática do fungo *C. posadasii*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito inibitório, *in vitro*, e o mecanismo de ação dos análogos químicos da isoniazida, isolados e em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii*.

4.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o potencial antifúngico *in vitro* dos análogos químicos da isoniazida, isolados em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, frente a cepas de *C. posadasii*.
2. Investigar o efeito dos análogos químicos da droga isoniazida, isolados e em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, sobre a concentração de ergosterol total em cepas de *C. posadasii*.
3. Verificar o efeito dos análogos químicos da droga isoniazida, isolados e em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, sobre o escape de moléculas da membrana plasmática de *C. posadasii*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Micro-organismos

Foram utilizadas 12 cepas de *C. posadasii*, sendo 10 cepas de isolados clínicos e 02 cepas de isolados ambientais. Todas as cepas descritas no estudo são pertencentes à micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. As cepas encontravam-se estocadas em salina fisiológica à temperatura ambiente. Antes da estocagem, os isolados foram identificados por meio de análise macroscópica, microscópica, PCR e/ou testes imunológicos (CORDEIRO et al., 2006; BRILHANTE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2010; BRILHANTE et al., 2013). Os isolados retirados do estoque foram repicados em ágar batata dextrose e incubados por até 7 dias a 35 °C.

Foram realizadas confirmações posteriores da pureza das cepas levando em consideração as características macromorfológicas do relevo e textura das colônias de *C. posadasii* e da análise de características micromorfológicas, com preparações do tipo lâmina-lamínula de fragmentos de cada colônia com lactofenol azul-algodão e observação em microscópio óptico quanto à presença de artroconídios (CORDEIRO et al., 2006c).

O tipo de amostra, origem, identificação e localização geográfica de cada isolado de *C. posadasii* incluído neste estudo está descrita na Tabela 1.

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação laboratorial das cepas foram realizados em cabine de segurança biológica classe II-B2 em laboratório de biossegurança nível 3 (NB-3), em virtude da alta virulência da espécie fúngica (SUTTON, 2007; HALL et al., 2008).

Tabela 1 – Tipo de amostra, origem, identificação e localização geográfica dos isolados clínicos e ambientais de *C. posadasii* incluídos neste estudo.

Nº da Coleção	Amostra	Origem geográfica
CEMM 01-6-088	Lavado brônquico	Santa Quitéria
CEMM 01-6-089	Lavado brônquico	Solonópoles
CEMM 01-6-090	Solo (toca de tatu)	Solonópoles
CEMM 01-6-092	Solo (toca de tatu)	Solonópoles
CEMM 01-6-101	Lavado brônquico	Solonópoles
CEMM 01-6-102	Lavado brônquico	Arneiroz
CEMM 01-6-103	Escarro	Aiuaba
CEMM 05-2-064	Lavado brônquico	Sobral
CEMM 05-2-066	Lavado brônquico	Sobral
CEMM 05-2-069	Lavado brônquico	Piauí
CEMM 05-2-070	Escarro	Parambu
CEMM 05-4-012	Escarro	Santa Quitéria

5.2 Síntese dos análogos da droga isoniazida

A síntese dos análogos da isoniazida foi realizada a partir da reação entre a droga isoniazida e diferentes cetonas conforme metodologia descrita por Cordeiro (2014), pelo método de preparação de bases de Schiff. As cetonas utilizadas nas reações foram acetofenona e seus derivados, conforme descrito por Cordeiro et al. (2014).

Marques (2013) analisou o efeito citotóxico dos compostos químicos da isoniazida frente a três linhagens de células tumorais: NCIH358M (pulmão - humano), PC-3M (próstata - humano) e OVACAR-8 (ovário - humano) descrevendo que seus respectivos valores de Concentração Inibitória Média - CI₅₀ > 250µg/mL, dessa forma mostrando que em nenhuma das amostras testadas apresentou efeito citotóxico.

Na Tabela 2 estão descritas as cetonas utilizadas na pesquisa, hidrazonas sintetizadas a partir das reações com diferentes cetonas, siglas utilizadas e fórmula molecular

dos análogos químicos da droga isoniazida. Na Figura 10 está descrita a estrutura química dos compostos.

Tabela 2 – Cetonas, hidrazonas, sigla e fórmula molecular dos análogos químicos da droga isoniazida empregados nesta pesquisa.

Cetona utilizada	Hidrazona	Siglas	Fórmula molecular
4'-Metoxiacetofenona	N'-(1-(4-metoxifenil)etilideno)isonicotinohidrazida	P3	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂
3'-Metilacetofenona	N'-(1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida	P5	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O
4'-Metilacetofenona	N'-(1-(4-metilfenil) etilideno)isonicotinohidrazida	P6	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O
Acetofenona	N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida	PACT	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O

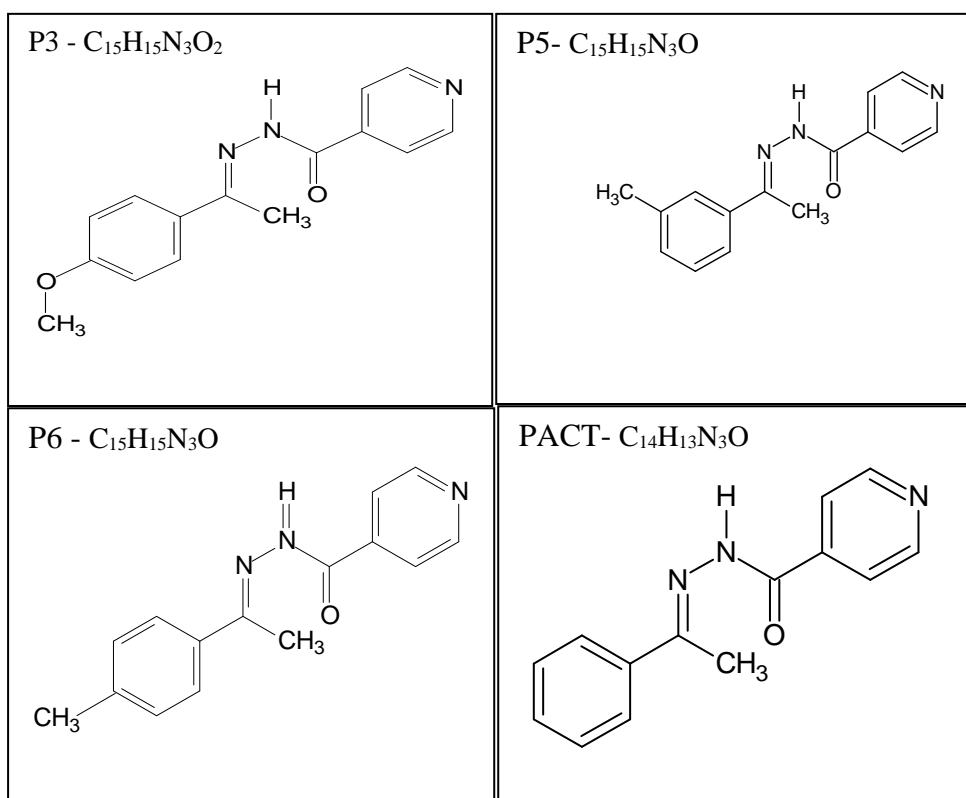


Figura 10 – Estruturas químicas e fórmula molecular dos análogos químicos da droga isoniazida. Fonte: Marques (2009).

5.3 Agentes antimicrobianos

Para o controle dos testes de sensibilidade, foram utilizadas duas drogas antifúngicas: anfotericina B (AMB, Sigma Chemical Corporation, EUA) e itraconazol (ITC, Janssen Pharmaceutica, Bélgica). As hidrazonas utilizadas na pesquisa foram a P3, P6, P5 e PACT. Esses compostos foram dissolvidos em solução estoque em Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co. EUA). Todas as soluções foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios, quando foram diluídas seriadamente em escala 1:2, 20x maior para compostos isolados, e 1:4, 40x maior para compostos usados em combinações com antifúngicos, em meio RPMI.

5.4 Atividade antifúngica dos análogos da isoniazida

5.4.1 Inóculo fúngico

Para o teste de atividade antifúngica, os inóculos foram preparados a partir de culturas de *C. posadasii* semeadas em ágar batata dextrose e incubadas por 7-10 dias a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. No preparo do inóculo, foi adicionado a cada cultura 1 mL de solução salina fisiológica (0,9%) estéril e, em seguida, a superfície do micélio foi raspada com auxílio de um garfo microbiológico a fim de conseguir uma suspensão de artroconídios e fragmentos de hifas (CORDEIRO et al., 2006). Cada suspensão fúngica foi transferida para um novo tubo estéril e ajustada com solução salina fisiológica à escala 0,5 de McFarland. A leitura dessas suspensões fúngicas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm, corresponde à transmitância de 95%. Em seguida, as suspensões fúngicas foram diluídas na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640 para obtenção de um inóculo final de 1 a 5×10^3 UFC.mL⁻¹ (CORDEIRO et al., 2006b).

5.4.2 Teste de sensibilidade *in vitro*

5.4.2.1 Teste de macrodiluição em caldo – drogas isoladas

Um total de 12 cepas de *C. posadasii*, sob a forma filamentosa, foi testado contra os análogos químicos da droga isoniazida para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM), através da metodologia de macrodiluição

em caldo conduzida de acordo com as diretrizes do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M38-A2 (CLSI, 2008). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram lidos visualmente. Os pontos finais de corte foram determinados após dois dias de incubação a 35 °C.

Os valores de CIM foram estabelecidos como a menor concentração capaz de inibir 100% para AMB e 80% para ITR e os análogos da isoniazida do crescimento fúngico visível quando comparado ao controle sem droga (CLSI, 2008; CORDEIRO et al., 2006b). Valores de CFM dos análogos foram definidos como a menor concentração de droga capaz de inviabilizar o crescimento fúngico após a semeadura em ágar batata durante 7 dias a 35 °C (LI et al., 2000). Os intervalos de concentração testados entre os análogos químicos da droga isoniazida e os antifúngicos anfotericina B e itraconazol estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Intervalos das concentrações dos análogos químicos da droga isoniazida e antifúngicos testados isoladamente e em combinação frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* (n=12).

Compostos	Concentração inicial do estoque (µg/mL)	Intervalo de Concentração (µg/mL)
Antifúngicos (AMB, ITC)	20	0,0625-1,0
INH	3000	750-1500
Análogos (P3,P5,P6)	16000	50-800
Análogo (PACT)	4000	12,5 -200
P3 + AMB	4000 / 1	0,005 – 0,1 / 0,025-0,007
P5 + AMB	16000 / 0,624	0,1-0,4 / 0,001-0,015
P6 + AMB	8000 / 0,312	0,05 -0,2 / 0,007-0,001
PACT + AMB	2000 / 0,156	0,05-0,2 / 0,001-0,003
P3 + ITC	16000 / 20	0,01-0,04 / 0,25-0,01
P5 + ITC	16000 / 2,5	0,4 / 0,0625
P6 + ITC	16000 / 20	0,4 / 0,5
PACT + ITC	2000 / 2,5	0,05-0,025 / 0,031-0,062

Legenda: AMB: anfotericina B; ITC: Itraconazol; P3: N⁷ (1-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N²- (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N¹- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida; PACT: N²- (1-feniletideno) isonicotinohidrazida.

5.4.2.2 Teste de Checkerboard – interação entre drogas

Após a definição dos valores de CIM para cada composto isoladamente, as cepas foram testadas contra as combinações formadas pelos análogos e drogas antifúngicos (AMB ou ITC), de acordo com o método de macrodiluição em *checkerboard* (JOHNSON et al., 2004). A CIM de cada fármaco utilizado na combinação foi definida como a menor concentração que causou 100% de inibição do crescimento fúngico visível quando comparado ao controle sem droga. As interações entre as drogas foram classificadas como sinérgicas, indiferentes ou antagônicas, de acordo com o índice de concentração inibitória fracionada (FICI), descrito por Odds (2003b), onde:

Cálculo do FICI	Parâmetros	
FIC A + FIC B		
FIC A = $\frac{\text{CIM A em combinação}}{\text{CIM A isolada}}$	$\text{FICI} \leq 0,5$	Sinergismo
FIC B = $\frac{\text{CIM B em combinação}}{\text{CIM B isolada}}$	$0,5 < \text{FICI} < 0,4$	Indiferente
	$\text{FICI} \geq 4,0$	Sinergismo

5.5 Influência dos análogos da isoniazida sobre o teor do ergosterol celular

A influência dos análogos sobre a concentração celular de ergosterol foi avaliada de acordo com a metodologia de Moran et al. (2007), com adaptações. As cepas de *C. posadasii* na forma filamentosa (n = 12) foram cultivadas em ágar batata a 35 °C por 7 dias. Após este período, uma suspensão fúngica de $1 \text{ a } 5 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ foi transferida para meio RPMI 1640 suplementado com os análogos da INH, em concentrações previamente definidas como 2xCIM, CIM e CIM/2, para cada cepa testada. Os tubos foram incubados durante 2 dias a 35 °C e, em seguida, cada tubo contendo a suspensão fúngica foi ajustado a escala 0,5 de McFarland e centrifugado a $9660 \times g$ durante 3 minutos. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em 0,5 mL de solução alcoólica de KOH a 20% e incubados durante 1 h a 95 °C em banho-maria. Após a incubação, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e, então, os esteróis totais foram extraídos por meio da adição de 0,6 mL de n-hexano (Sigma-Aldrich) e agitados em vórtex durante 10 s. Os tubos foram centrifugados a $13.416 \times g$ durante 1 minuto. A camada superior orgânica foi transferida para um novo tubo e 1 mL de

n-hexano foi adicionado. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro a 295 nm. A quantificação do ergosterol foi realizada por comparação da curva padrão com ergosterol comercial (Sigma - Aldrich, Alemanha). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata. Os resultados foram comparados com o conteúdo do ergosterol de células cultivadas em meio RPMI 1640 sem os análogos. As amostras tratadas com ITC e INH nas concentrações 2xCIM, CIM, CIM/2 foram utilizadas como controles positivos de diminuição da concentração de ergosterol (CORDEIRO et al., 2014).

5.6 Influência dos análogos da isoniazida sobre a integridade da membrana plasmática

A influência dos análogos da INH sobre a integridade e permeabilidade da membrana celular foi realizada conforme sugerido por Devi et al. (2010), com adaptações, para cepas de *C. posadasii* (n = 12) em forma filamentosa. Os isolados foram cultivados em meio RPMI 1640, acrescidos das CIM e CIM/2 dos análogos da INH, previamente definidas, durante 2 dias em 28 °C e 35 °C. Após esse período, os tubos foram centrifugados a $13416 \times g$ durante 15 minutos. Os sobrenadantes de cultivo foram filtrados em membrana de 0,22 μm para remoção das células vegetativas e debris celulares. Os sobrenadantes foram então diluídos na proporção 1:10 em água destilada estéril, e a liberação de moléculas com picos de absorção de UV a λ :260 e λ :280nm para compostos fenólicos. Foram realizados cultivos dos isolados em meio RPMI 1640 sem a adição dos análogos como controles positivos de integridade de membrana plasmática fúngica (CORDEIRO et al., 2014).

5.7 Análise estatística

A sensibilidade antimicrobiana foi comparada por meio de análise *one-way* de variância (ANOVA) e pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos análogos da isoniazida frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii*

Todos os análogos da isoniazida inibiram o crescimento das cepas de *C. posadasii* *in vitro*. Após o período de incubação de 2 dias a 35 °C, os seguintes intervalos de CIM foram obtidos: INH: 750 a 1500 µg/mL (média geométrica: 891,9 µg/mL); P3: 100 a 400 µg/mL (média geométrica: 224,4 µg/mL); P5 e P6: 100 a 400 µg/mL (média geométrica: 211,8 µg/mL); e PACT: 50 a 100 µg/mL (média geométrica: 50 µg/mL). Os valores de CFM variaram de 200 a 800 µg/mL (média geométrica: 448,9 µg/mL) para P3, 200 a 800 µg/mL (média geométrica: 475,6 µg/mL) para P5 e P6 e de 200 a 400 µg/mL (média geométrica: 224,4 µg/mL) para PACT. Todos os dados estão apresentados na Tabela 4.

No tocante às drogas antifúngicas, todas as cepas foram inibidas pelos antifúngicos anfotericina B e itraconazol, com valores de CIM que variaram de 0,0625 a 0,125 µg/mL (média geométrica: 0,105 µg/mL) para AMB e 0,125 a 0,5 µg/mL (média geométrica: 0,177 µg/mL) para ITC, conforme representado na Tabela 4.

Quando comparados à INH, todos os análogos apresentaram valores de CIM menores ($p < 0.05$). Quando comparados entre si, o análogo que melhor apresentou valor de CIM para *C. posadasii* foi o análogo PACT ($p < 0.05$) e os maiores valores de CIM foram observados para o análogo P3. Quanto ao CFM, foi observado que os análogos P3 e PACT apresentaram menores valores quando comparados aos análogos P5 e P6. A droga INH e os antifúngicos AMB e ITC foram usados como controle dos testes de sensibilidade. A cepa *C. parapsilosis* ATCC 2209 mostrou valores de CIM para anfotericina B no intervalo de 0,5 a 4,0 µg/mL e para itraconazol de 0,12 a 0,5 µg/mL.

Tabela 4 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) dos análogos da isoniazida e antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$) testados isoladamente frente às cepas clínicas e ambientais de *Coccidioides posadasii* (n=12).

Cepas Código CEMM	P3		P5		P6		PACT		INH	AMB	ITC
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CIM	CIM
01-06-088	400	800	200	800	200	800	50	200	1500	0,125	0,125
01-06-089	200	400	100	200	200	400	100	200	750	0,125	0,125
01-06-090	400	800	400	800	400	800	25	400	750	0,125	0,25
01-06-092	200	400	200	800	100	400	50	200	750	0,125	0,25
01-06-101	200	400	200	400	200	400	50	200	750	0,0625	0,125
01-06-102	200	400	200	400	200	400	50	200	1500	0,125	0,125
01-06-103	400	800	400	800	400	800	50	200	750	0,125	0,5
05-02-064	100	200	200	400	400	800	25	400	1500	0,125	0,25
05-02-066	200	400	200	400	400	800	100	200	750	0,0625	0,25
05-02-069	200	400	100	200	100	200	50	200	750	0,125	0,125
05-02-070	200	400	200	400	200	400	50	200	750	0,0625	0,125
05-04-012	200	400	400	800	100	200	50	200	750	0,125	0,125
Média Geométrica	224,4	448,9	211,8	475,6	211,8	475,6	50	224,4	891,9	0,105	0,177

Legenda: P3: N⁷- (1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida, P5: N⁷- (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N⁷- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida, PACT: N⁷- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida, INH: isoniazida, AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol.

6.2 Sensibilidade de cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* frente aos análogos da isoniazida em combinações com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol

Quanto às combinações formadas pelos análogos da isoniazida e os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, observou-se que todas as combinações foram capazes de inibir o crescimento, *in vitro*, das cepas de *C. posadasii*. A interação sinérgica foi detectado nas quatro combinações com AMB e em duas combinações com ITC, sendo um total de seis combinações, frente todas as cepas de *C. posadasii* (n=12), não sendo observado antagonismo em nenhuma delas.

De acordo com os resultados obtidos, todas as combinações formadas pelos análogos da isoniazida e a anfotericina B mostraram interações sinérgicas contra *C. posadasii*, apresentando as seguintes médias geométricas de CIM: P3 [31,5] + AMB [0,031]; P5 [56,1] + AMB [56,1]; P6 [42] + AMB [42] e PACT [10,5] + AMB [10,5]. Já para os análogos e o ITC, duas combinações mostraram interações sinérgicas contra *C. posadasii*, apresentando as seguintes médias geométricas de CIM: P5 [56,1] + ITC [0,007] e PACT [0,0624] + ITC [2]. As combinações P3 [317,5] + ITC [0,250] e P6 [317,5] + ITC [0,315] foram excluídas da pesquisa por apresentarem valores indiferentes.

Os resultados da associação entre os análogos da isoniazida e os antifúngicos mostraram que a associação entre P3+AMB exibiu efeito sinérgico em sete das doze cepas testadas, P5+AMB em dez das doze cepas, P6+AMB e PACT+ AMB em onze das doze cepas, P5+ITC em nove das doze cepas e PACT+ITC em onze das doze cepas testadas. Todos os valores das variações de CIM, FICI e média geométrica estão descritos na Tabela 5.

Por fim, os dados obtidos evidenciaram que as combinações P6+AMB, PACT+AMB e PACT+ITC exibiram efeito sinérgico na maioria das cepas testadas, sendo as combinações que obtiveram a maior taxa de sinergismo, com exceção de uma cepa que apresentou FICI igual a 2,01.

Tabela 5 – Variação dos valores e média geométrica de CIM e variação de FICI dos análogos da isoniazida combinados com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, em µg/mL, frente às cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* (n=12).

Combinação	Variação		Média geométrica		Variação FICI	Sinergismo (n)
	CIM		CIM			
	Análogo	Antifúngico	Análogo	Antifúngico		
P3 +AMB	12,5-100	0,031-0,0625	31,5	0,031	0,281-1,125	07/12
P5 +AMB	25-100	0,001-0,003	56,1	56,1	0,140-1,007	10/12
P6 +AMB	25-100	0,0009-0,003	42	42	0,140-0,562	11/12
PACT +AMB	12,5-50	0,0009-0,001	10,5	10,5	0,128-2,015	11/12
P3 +ITC	200-400	0,125-0,5	317,5	0,250	0,521-2	I
P5 + ITC	25-100	0,0009-0,06	56,1	0,007	0,0132-2,24	9/12
P6 + ITC	200-400	0,125-1	317,5	0,315	0,625-1	I
PACT + ITC	3,125 -12,5	0,0004-0,5	7	0,004	0,0624-2	11/12

Legenda - I: Indiferente; P3: N^o - (1- (4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N^o - (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N^o- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida; PACT: N^o - (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol.

6.3 Determinação do efeito *in vitro* dos análogos da isoniazida isolados e combinados com antifúngicos sobre o teor de ergosterol celular frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii*

6.3.1 Análogos isolados

A influência dos análogos isolados sobre a concentração celular de ergosterol das doze cepas de *C. posadasii* está representada na Tabela 6. Os valores de concentração de ergosterol para todas as cepas testadas (n=12) e controles estão expressos nas tabelas dos Apêndices A-D.

O teor de ergosterol foi determinado para cada cepa cultivada em diferentes concentrações das drogas em estudo (2xCIM, CIM e CIM/2). Foi observada uma redução significativa no teor de ergosterol após determinado tempo de incubação de 2 dias de acordo com a espécie fúngica, à medida que se aumentava a concentração de cada droga.

Todavia, os dados representados na Tabela 6 mostraram que, dos quatro análogos testados isoladamente contra as cepas de *C. posadasii*, somente P5 e PACT se mostraram efetivos na diminuição da concentração do ergosterol celular, obtendo as menores médias geométricas quando comparada com o controle sem droga. ITC foi utilizado como controle de qualidade para as todas as cepas testadas, observando-se uma diminuição significativa na produção de ergosterol nas concentrações 2xCIM, CIM e CIM/2. De um modo geral, não houve diferença estatística significativa entre os resultados apresentados por INH e ITC ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Concentração celular do ergosterol de cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* (n=12) após exposição à hidrazonas, isoniazida, anfotericina B e itraconazol. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média.

Compostos	Concentração de ergosterol (μ M)		
	2xCIM	CIM	CIM/2
P3	16,47 \pm 1,3*	19,86 \pm 1,1*	22,19 \pm 1,0*
P5	12,4 \pm 1,2**	15,85 \pm 1,4**	18,21 \pm 1,4**
P6	16,26 \pm 1,13*	19,76 \pm 0,94*	23,34 \pm 0,52*
PACT	11,32 \pm 0,96**	13,02 \pm 0,77**	17,24 \pm 1,3**
INH	10,27 \pm 0,48	13,23 \pm 0,35	15,26 \pm 0,64
ITC	5,24 \pm 0,5	10,58 \pm 0,45	15,2 \pm 0,4
AMB	11,17 \pm 1,99	16,70 \pm 0,87	17,93 \pm 1,56
Controle 29,18 \pm 0,49			

Legenda - C: controle; P3: N⁷ -(1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N⁷ - (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N¹- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida; PACT: N⁷ - (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; INH: isoniazida; ITC: itraconazol; * Significância estatística em relação ao controle ($p < 0,05$) e ** Significância estatística entre os análogos ($p < 0,05$).

6.3.2 Análogos combinados

Os resultados da influência dos análogos da isoniazida, utilizados em concentrações sinérgicas com os antifúngicos ITC e AMB, sobre a concentração celular do ergosterol de oito (08) cepas de *C. posadasii* está representada de acordo com a média \pm erro padrão (Tabela 7). Os valores de concentração de ergosterol para todas as cepas testadas e controles estão expressos nas tabelas dos Apêndices E-G.

Todos os análogos da isoniazida testados em combinação com os antifúngicos foram capazes de diminuir a concentração celular de ergosterol quando comparados com o controle sem nenhum tratamento ($p < 0,05$). Foi possível observar que todos os análogos testados em combinação com ITC apresentaram semelhança nos resultados dos análogos testados em combinação com AMB, quando comparados entre si, sendo somente observada diferença no análogo PACT que, na concentração de CIM/2, a combinação com ITC apresentou maior capacidade de diminuição do ergosterol quando comparada à combinação com AMB.

Tabela 7 – Concentração celular do ergosterol de cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* (n=08) após exposição aos análogos da isoniazida em combinação com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média.

Combinações	Concentração de ergosterol (μ M)		
	2xCIM	CIM	CIM/2
P3 + AMB	10,48 \pm 0,26*	14,42 \pm 0,32*	18,37 \pm 0,42*
P3 + ITC	10,06 \pm 0,39*	15,33 \pm 1,3*	18,59 \pm 0,91*
P6 + AMB	11,76 \pm 0,32*	13,47 \pm 0,15*	13,94 \pm 0,24*
P6 + ITC	14,74 \pm 0,78*	17,16 \pm 0,13*	17,66 \pm 0,07*
PACT + AMB	9,96 \pm 0,27*	11,93 \pm 0,54*	19,16 \pm 0,32*
PACT + ITC	10,48 \pm 0,25*	13,31 \pm 0,25*	14,34 \pm 0,16*
Controle 29,18 \pm 0,49			
INH* 12,92 \pm 0,44			

Legenda - C: controle; INH: isoniazida; AMB: anfotericina B; ITC: Itraconazol; PACT: N²- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; P3: N²-(1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N²- (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N²- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida; 2xCIM, CIM e CIM/2 combinados. * Significância estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.4 Determinação do efeito *in vitro* dos análogos da isoniazida sobre a integridade da membrana plasmática, isolados e combinados, frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii*

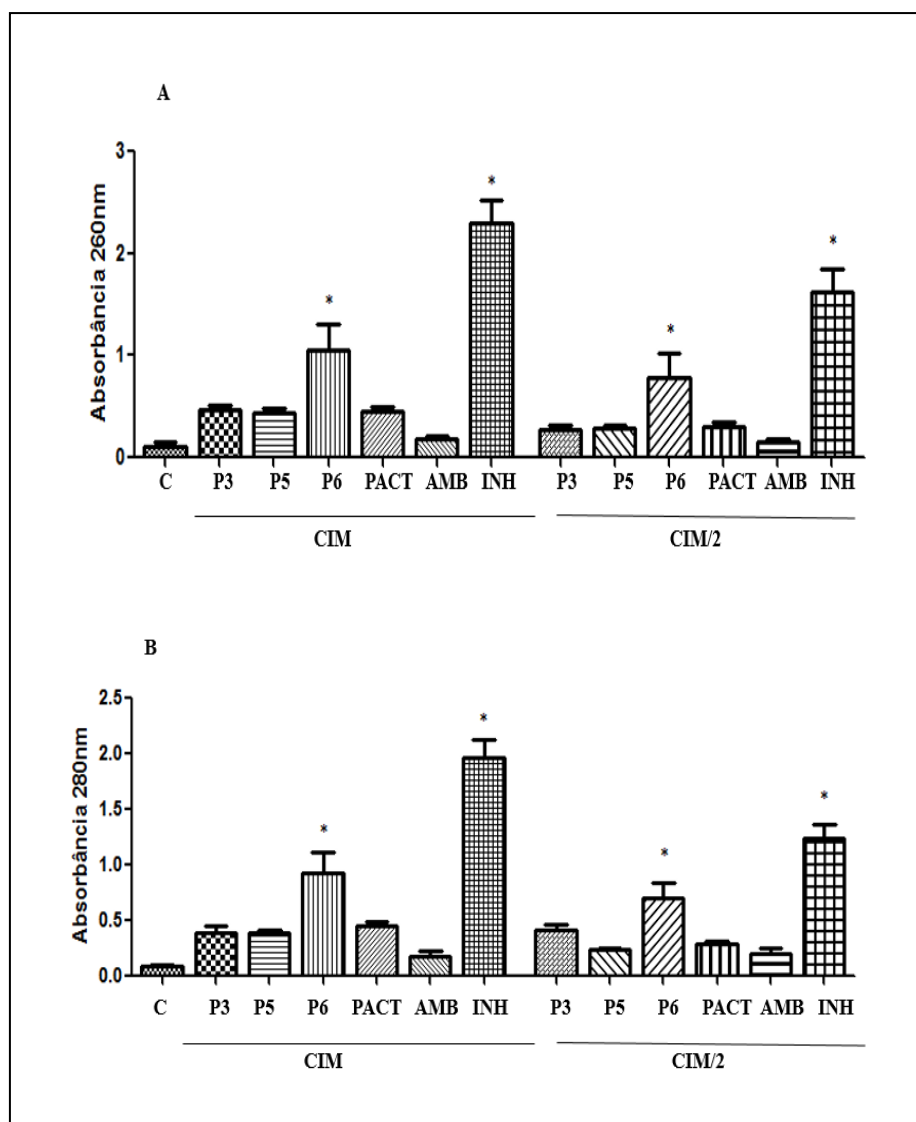
6.4.1 Análogos isolados

A influência dos análogos isolados sobre a integridade da membrana plasmática de oito cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* está representada no gráfico da Figura 11. Os valores de absorvância óptica (DO) são diretamente proporcional a concentração do espécime absorvente de luz presente na mostra para todas as cepas testadas e controles estão expressos nas tabelas dos Apêndices H e I.

Todos os análogos da isoniazida (P3, P5, P6 e PACT) testados mostraram extravasamento de macromoléculas, sendo capazes de romper a integridade da membrana celular fúngica quando comparadas ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). O análogo P6 manteve-se em nível de absorvância maior que os demais compostos nas

concentrações CIM e CIM/2 quando comparado a AMB e ao controle de tratamento. Já os demais análogos (P3, P5 e PACT) mantiveram-se sem relevância estatística para o CIM/2 quando comparados com AMB e controle sem droga, salientando que a droga INH permaneceu com uma maior atividade sobre a membrana celular fúngica nas concentrações de CIM e CIM/2.

Figura 11 – Absorbâncias do conteúdo extracelular de células de *C. posadasii* (n=8) a 260nm (A) e 280nm (B) tratadas com os análogos da isoniazida.



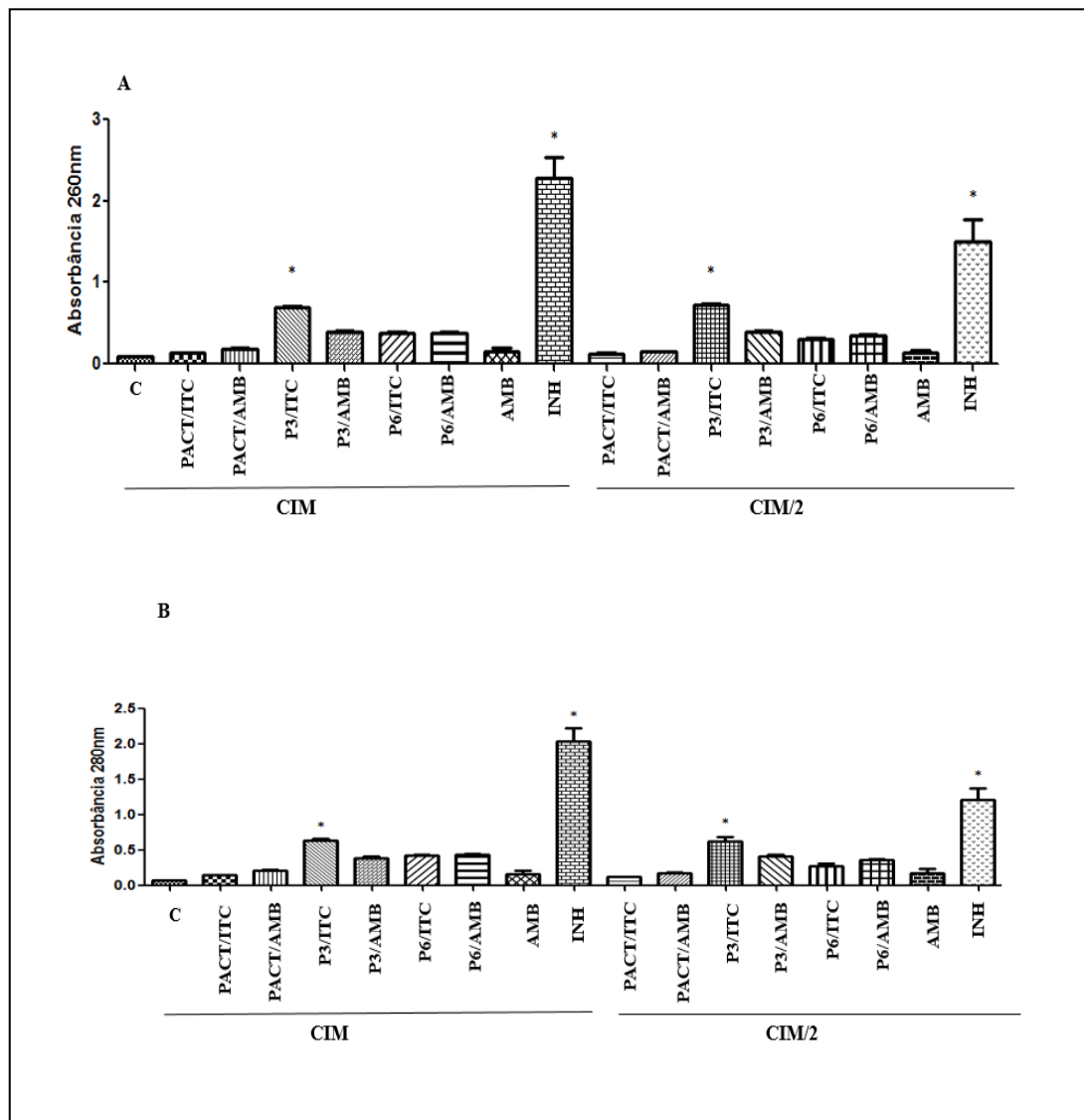
C: Controle; P3: N' -(1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N' -(1-m-tolileilideno) isonicotinohidrazida; P6: N' - (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida. AMB: anfotericina B; INH: isoniazida e PACT: N' - (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida. * Significância estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor

6.4.2 Análogos combinados

A influência dos análogos em combinação com antifúngicos sobre a integridade da membrana plasmática das oito cepas de *C. posadasii* está representada no gráfico da Figura 12. Os valores de densidade óptica para todas as cepas testadas e controles estão expressos nas tabelas dos Apêndices J e K.

Todos os análogos da isoniazida testados em combinação com AMB e ITC mostraram extravasamento de macromoléculas, sendo capazes de romper a integridade da membrana celular fúngica quando comparadas ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). O análogo P3, nas concentrações de CIM e CIM/2, manteve-se em nível de absorvância maior que os demais compostos quando comparado a AMB e ITC e ao controle de tratamento. Já os demais análogos (P6, P5 e PACT) mantiveram-se sem relevância estatística pra o CIM e CIM/2 quando comparados com AMB e ITC e controle sem droga, salientando que a droga INH permaneceu com uma maior atividade sobre a membrana celular fúngica nas concentrações de CIM e CIM/2.

Figura 12 – Absorbâncias do conteúdo extracelular das células de *C. posadasii* (n=8) a 260nm (A) e 280nm (B) tratadas com os análogos da isoniazida.



C: Controle; AMB: anfotericina B; INH: isoniazida; PACT: N¹- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; P3: N¹-(1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N¹- (1-m-tolileilideno) isonicotinohidrazida; P6: N¹- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida. * Significância estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

8. DISCUSSÃO

A disponibilidade de um pequeno número de drogas antifúngicas como anfoterina B, derivados azólicos e equinocandinas (GONZÁLEZ, 2009) e o aparecimento de cepas patogênicas resistentes aos fármacos acarretam dificuldades ao tratamento dessas micoses, o que leva a necessidade de uma busca por novos compostos e moléculas ativas, investigando o potencial antifúngico de drogas não utilizadas na terapia antifúngica, como os agentes imunossuppressores, antiparasitários e antibióticos (AFELTRA; VERWEIJ, 2003; AFELTRA et al., 2004).

Apesar do desenvolvimento de novos fármacos, o aumento no número de casos de micoses profundas e oportunistas tem sido motivo de preocupação para a comunidade médica e científica (ESPINEL-INGROFF, 2009). Dessa maneira, vários estudos têm contribuído para o desenvolvimento de novos agentes a fim de ampliar o arsenal terapêutico antifúngico, como por exemplo, compostos da classe dos derivados azólicos, como o voriconazol, posaconazol e ravuconazol, e da classe das equinocandinas, como a caspofungina, micafungina e anidulafungina (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

Novos planos com resultados promissores vêm sendo testados com o uso da combinação de antifúngicos frente a diversos patógenos (HO et al., 2007). Dentre as combinações já descritas estão os derivados azólicos com poliênicos, equinocandinas com azólicos ou poliênicos, as quais têm apresentado interação *in vitro* frente à diversas espécies fúngicas como, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Scedosporium* spp. (ARIKAN et al., 2002; BARCHIESI et al., 2000, 2004, 2005; YUSTES & GUARRO, 2005; YU et al., 2008).

Estudos recentes mostram que drogas antituberculose possuem efeito inibitório *in vitro* frente a vários agentes de micoses sistêmicas, tais como os fungos dimórficos *C. posadasii* e *H. capsulatum* (CHOTMONGKOL; METHAWASIN, 2001; CORDEIRO et al., 2006b; EL-AZIZI, 2007). Essas drogas vêm sendo testadas de maneira isolada ou em combinação com drogas clássicas antifúngicas, tais como anfotericina B e itraconazol (CORDEIRO et al., 2009). Ou seja, a interação entre elas pode se mostrar como uma alternativa para o tratamento de pacientes com infecções fúngicas graves e de difícil diagnóstico (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006).

Cordeiro et al. (2009) recentemente avaliaram o efeito antifúngico da droga antituberculose isoniazida frente a cepas de *C. posadasii* e observaram sua eficácia *in vitro*, isolada e em combinação com os derivados azólicos fluconazol, itraconazol e voriconazol.

Baseado na necessidade da busca de novos agentes com potencial antifúngico, o presente estudo avaliou o efeito *in vitro* dos análogos da droga isoniazida frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* denominados de: P3: [N^o-(1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida]; P5: [N^o-(1-m-tolileidene) isonicotinohidrazida]; P6: [N^o-(1-(4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida]; e PACT: [N^o-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida].

O efeito *in vitro* dos análogos da droga isoniazida, associados ou não aos derivados azólicos, foi investigada através da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de macrodiluição em caldo, conforme protocolo descrito no documento M38-A2, preconizado pelo CLSI (2008). Essa técnica é muito utilizada nos laboratórios de micologia, com resultados fáceis de ler e interpretar, permitindo uma melhor padronização como temperatura, período de incubação, meios de cultura e determinação dos pontos de corte (*breakpoints*). Porém, o documento M38-A2 não contemplam a análise de sensibilidade *in vitro* de *C. posadasii*.

Mesmo com a ausência dos testes de sensibilidade para fungos dimórficos descrita no documento M38-A2 (2008), várias são as pesquisas que utilizam a técnica da macrodiluição em caldo, onde realizam os testes na forma filamentosa do fungo, atribuindo-lhes modificações para o melhor aproveitamento da técnica, como, por exemplo, o tempo de leitura e a concentração do inóculo fúngico (ANDREU et al., 2003).

No tocante às hidrazonas derivadas da droga isoniazida avaliadas no presente estudo, estas são moléculas quimicamente classificadas como iminas, as quais apresentam um grupo funcional com estrutura geral $R_1R_2C=N-NR_3R_4$, onde R" pode ser um H ou um grupo orgânico, sendo nesse último caso conhecida também como base de Schif (UPPAL et al., 2011). São compostos formados pela reação de condensação entre cetonas ou aldeídos e uma hidrazida, catalisada pela presença de ácido ou base (MARQUES, 2013).

Em relação à estrutura química dos compostos sintetizados por Marques (2013), podemos observar que todos os análogos possuem, em sua estrutura, o princípio

ativo fenil etilideno isonicotinohidrazida, que se mantém presente em todas as substâncias com modificações estruturais da seguinte forma: para o análogo P3 a presença de 1-(4-metoxi-fenil); P5 de 1- (3-metilfenil) etilideno; P6 de 1- (4-metilfenil) etilideno; e para PACT o (fenil). Estas composições revelam, assim, possibilidades de diferentes compostos que podem ser consideradas moléculas biologicamente ativas.

Bajda et al. (2008) afirmaram que a lipofilicidade é uma propriedade fundamental dos compostos biológicos ativos. Desta forma, foi visto por Rastogi et al. (1981) que a maioria dos fármacos ativos contra as micobactérias são moléculas hidrofóbicas que são capazes de interagir com a superfície hidrofílica da camada exterior da bactéria e estão tornando-se alvos dos pesquisadores devido sua ampla variedade de propriedades que vão desde atividades antibacteriana, antifúngica, antituberculose (JUDGE et al., 2012), anti-inflamatória (SANGLARG et al., 2009), analgésica, anticonvulsivante (REIS et al., 2011), antimalárica (MELNYK et al., 2006), antitumoral (TERZIOGLU; GÜRISOY, 2003), dentre outras.

O grupo funcional das hidrazonas está presente em diversas substâncias com atividade biológicas já descritas na literatura e que podem ser utilizadas como modelos para planejamento de candidatos a novos compostos. Romero (2009) descreveu a ação do composto N-acilidrazonas, *in vitro*, sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, enquanto Melnyk et al. (2009) descreveu uma coleção de acilidrazonas ativas contra linhagem de *Plasmodium falciparum*, a cloroquinona. Kaplancikli et al. (2008) sintetizaram e avaliaram *in vitro* os derivados da hidrazida imidazol [1,2-a] piridina contra *M. tuberculosis*, que apresentaram CIM de 6,25 µg/mL. Masunari e Tavares (2007) demonstraram efeito antibacteriano dos análogos da nifuroxazina contra *S. aureus*.

Judge et al. (2009) estudaram o potencial antibacteriano, antifúngico, antimicobacteriano e antiviral de uma série de hidrazonas provenientes da isoniazida e testaram esses compostos frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *M. tuberculosis*, *C. albicans*, *A. niger*, além de vírus de DNA e RNA. Os resultados mostraram que as hidrazonas sintetizadas foram capazes de inibir o crescimento das bactérias e dos fungos testados, apresentando valores de CIM igual ou menor que o agente antibacteriano norfloxacina e o antifúngico fluconazol.

Secci et al. (2012) sintetizaram a hidrazida 4-(4-iodophenyl) thiazol-2-yl) que apresentou efeito *in vitro* com CIM de 0,25 µg/mL contra *Candida* spp. Altintop et

al. (2012) sintetizaram o 2-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]] acetohidrazida e relataram CIM de 0,05 µg/mL também contra espécimes de *Candida* spp. Visbal et al. (2011) sintetizaram quatro análogos de hidrazona que apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra o fungo dimórfico *P. brasiliensis*. Maillard et al. (2013) sintetizam a hidrazida (4-(4-iodofenil)-tiazol-2-il), exibindo atividade *in vitro* contra espécimes de *Candida* spp., apresentando CIM de 0,25 µg/mL. Mais recentemente, Cordeiro et al. (2014) avaliaram a hidrazona PACT: [N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida], sintetizada a partir da droga isoniazida (INH), contra cepas de *H. capsulatum*.

No presente estudo, todas as hidrazonas sintetizadas da droga isoniazida testadas (P3, P5, P6 e PACT) demonstraram atividade antifúngica *in vitro* frente a cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii*. No entanto, o melhor resultado foi obtido com o análogo PACT, cujos valores de CIM variaram entre 50 a 100 µg/mL. Resultados semelhantes foram obtidos por Marques (2013) ao estudar o efeito do mesmo análogo frente a cepas de *H. capsulatum*. O análogo PACT foi capaz de inibir o crescimento de *H. capsulatum* com valores de CIM que variaram de 15,6 a 250 µg/mL para a fase filamentosa e 7,8 a 250 µg/mL para a fase leveduriforme.

Quanto a sensibilidade de *C. posadasii* em combinação entre os análogos da isoniazida e os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, também observou-se que P3, P5, P6 e PACT foram capazes de diminuir significativamente o CIM para AMB. Já para ITC, somente os análogos P5 e PACT obtiveram valores relevantes na redução de CIM. As combinações entre PACT/AMB e P6/AMB também mostraram maior interação sinérgica entre os compostos, mostrando sinergismo em 11 de 12 cepas de *C. posadasii*, com valores de CIM que variaram entre 0,128 a 2,015 e 0,140 a 0,562, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Marques (2013) ao estudar a interação entre a hidrazona PACT em combinação com AMB, que mostrou sinergismo em 14 das 18 cepas de *H. capsulatum* na forma filamentosa, com valores de CIM que variaram entre 0,009-0,78 µg/mL. Para a fase leveduriforme, a combinação de drogas mostrou valores de CIM que variaram entre 0,04-0,56. Já as demais combinações testadas entre os análogos P3, P5, P6 e os antifúngicos anfotericina B e itraconazol frente a cepas de *C. posadasii* são pioneiras na literatura.

Com o objetivo de compreender o mecanismo de ação dos compostos P3, P5, P6 e PACT, foi investigado o efeito dessas drogas sobre o conteúdo total de ergosterol celular e a permeabilidade da membrana plasmática. O ergosterol é a

molécula lipídica predominante em células fúngicas que regula a fluidez, a permeabilidade da membrana, e a atividade de muitas enzimas incorporadas a ela. Assim, as atividades funcionais do ergosterol desempenham um papel importante no crescimento celular (PARVEEN et al., 2004).

Os análogos da isoniazida foram capazes de diminuir significativamente a concentração de ergosterol celular frente as cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* testadas isoladamente (n=12) e em combinação (n=8) com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, permitindo observar que dos quatro (4) análogos testados, PACT e P5 foram os mais efetivos na diminuição da concentração celular de ergosterol quando comparados com os análogos P3 e P6.

Marques (2013) descreveu que o análogo PACT na concentração suprainibitória (CIM/2) foi capaz de reduzir o teor de ergosterol frente a cepas de *H. capsulatum*. Por sua vez, no presente estudo, os resultados obtidos corroboram com o exposto acima, uma vez que foi demonstrado que a concentração de ergosterol celular diminuiu quando as cepas de *C. posadasii* foram expostas a esse mesmo análogo em doses inibitórias e sub-inibitórias. Tal efeito também foi observado quando houve exposição das células ao itraconazol, que sabidamente inibe a síntese de ergosterol.

Visbal et al. (2011) também avaliaram os efeitos inibitórios de análogos de hidrazona frente a cepas de *P. brasiliensis* e observou inibição do crescimento em torno de 90%. Os autores mostraram que os derivados de hidrazona são capazes de afetar o crescimento fúngico através da inibição da síntese de brassicasterol (esterol predominante) e do ergosterol. No entanto, um dos compostos não mostrou associação com qualquer etapa do bloqueio da via biossintética dos esteróis, sugerindo diferentes mecanismos de ação.

O resultado obtido nesse trabalho descreveu que todos os análogos da isoniazida foram capazes de desestabilizar a integridade da membrana de *C. posadasii*, obtendo o maior escape de macromoléculas. Sendo observado que o análogo P6 testado isoladamente e o análogo P3 em combinação com itraconazol foram os mais efetivos no extravasamento dessas moléculas. A dispersão dos componentes intracelulares sugere que o efeito crucial dessas drogas nas células fúngicas está relacionado à formação de poros na membrana citoplasmática, provocando uma lise celular subsequente. Essa liberação de conteúdo intracelular é considerada um forte indicativo de danos e perda da integridade da membrana plasmática (CARSON; MEE; RILEY, 2002; DEVI et al.,

2010). Cordeiro et al. (2014) descreveram que a droga INH e o análogo PACT são capazes de alterar a integridade da membrana de *H. capsulatum*.

Portanto, podemos concluir que os análogos da isoniazida (P3, P5, P6 e PACT) apresentaram resultados promissores na busca por novos compostos com atividade antifúngica frente *C. posadasii*. Considerando a baixa toxicidade já anteriormente demonstrada dos compostos (MARQUES, 2013), aliado a seu elevado potencial inibitório evidenciado frente a cepas de *C. posadasii*, *in vitro*, e sua atividade sobre o teor de ergosterol total e permeabilidade da membrana plasmática, bem como, sua ação adjuvante para aumentar a sensibilidade deste patógeno a drogas antifúngicas.

Diante do exposto, os dados obtidos apontam novas alternativas para o tratamento da coccidioidomicose, sendo necessários novos estudos que visem continuar a investigação do mecanismo de ação desses compostos derivados da droga isoniazida no metabolismo celular fúngico, bem como realizar experimentos *in vivo* para confirmar a significância desses resultados.

9. CONCLUSÃO

1. As hidrazonas P3: [N' - (1- (4-methoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida], P5: [N' -(1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida], P6: [N' - (1-(4 metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida] e PACT: [N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida] foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *C. posadasii*. Dentre todos os derivados, o análogo químico PACT apresentou o menor valor de CIM.
2. As hidrazonas P3: [N' -(1-(4-methoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida], P5: [N' -(1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida], P6: [N' -(1-(4 metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida] e PACT: [N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida] foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de cepas de *C. posadasii* combinados com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol.
3. As hidrazonas P3: [N' -(1-(4-methoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida], P5: [N'-(1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida], P6: [N'-(1-(4 metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida] e PACT: [N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida] foram capazes de provocar redução do teor de ergosterol total em cepas de *C. posadasii*. Os análogos químicos isolados, formado a partir da P5 e PACT e todos os análogos combinados com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, mostraram-se mais efetivos na diminuição da concentração de ergosterol celular.
4. As hidrazonas P3: [N' -(1-(4-methoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida], P5: [N'-(1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida], P6: [N'-(1-(4 metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida] e PACT: [N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida] induziram alterações na estrutura da membrana plasmática de cepas de *C. posadasii* em todas as concentrações testadas. O análogo P6 isolado e P3 em combinação com itraconazol permitiram o maior escape de macromoléculas essenciais ao crescimento fúngico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFELTRA, J.; VERWEIJ, P.E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, p. 397-407, 2003.

AFELTRA, J.; VITALE, R. G.; MOUTON, J. W.; VERWEIJ, P. E. Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1335-1343, 2004.

ALTINTOP, L. et al. Strongyloides stercoralis hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis and bronchial asthma: a case report. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Londres, v. 9, n. 1, p. 27, 2012.

AMPEL, Neil M. Coccidioidomycosis in persons infected with HIV type 1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 7, p. 1174-1178, 2005.

AMPEL NM, GIBLIN A, MOURANI JP, GALGANI JN. Factors and outcomes associated with the decision to treat primary pulmonary coccidioidomycosis. **Clin Infect Diseases**. 2009; 48(2):172-8.

ANTONY, S. Use of the echinocandins (caspofungin) in the treatment of disseminated coccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 879-880, 2004.

AGUILAR, P. S., HERNANDEZ –ARRIAGA, A. M., CYBULSKI, L. E., ERAZO, A. C., DE MENDONZA D. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 7, p. 1681-1691, 2001.

BAKIR, M., DOSANJH, D. P., DEEKS, J. J., SOYSAL, A., MILLINGTON, K. A., EFE, S., ASLAN, Y., POLAT, D., KODALLI N, YAGCI, A., BARLAN, I., BAHCECILER, N., DEMIRALP, E. E., LALVANI, A. Use of T cell-based diagnosis of tuberculosis infection to optimize interpretation of tuberculin skin testing for child tuberculosis contacts. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 3, p. 302-312, 2009.

BERALDO, Heloisa. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, R. L. Goodman & Gilman's **the pharmacological basis of therapeutics**. 11ª edição. Nova York: McGraw-Hill, 2006, p. 1103-1118.

BIALEK, R.; KERN, J.; HERRMANN, T.; TIJERINA, R.; CECEÑAS, L.; REISCHL, U.; GONZÁLEZ, G. M. PCR Assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 778–783, 2004.

BLAIR, J. E.; COAKLEY, B.; SANTELLI, A. C.; HENTZ, J. G.; WENGENACK, N. L. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 317-324, 2006.

BLAIR, J. E.; MAYER, A. P.; CURRIER, J.; FILES, J. A.; WU, Q. Coccidioidomycosis in elderly persons. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 12, p. 1513-1518, 2008.

BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F.; FECHINE, M. A.; FURTADO, F. M.; NAGAO-DIAS, A. T.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 1288-1292, 2008.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3978-3979, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; ALENCAR, L. P.; CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C.; TEIXEIRA, C. E. C.; MACEDO, R. B.; LIMA, D. T.; PAIVA, M. A. N.; MONTEIRO, A. J.; ALVES, N. D.; OLIVEIRA, M. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, 2013.

CAMPOS, H. S. Tratamento da tuberculose. **Pulmão**, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2007.

CARSON, C. F., MEE, B. J., RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CASTAÑEDA-GODOY, R.; LANIADO-LABORIN, R. Coexistência de tuberculosis y coccidioidomicosis. Presentación dos casos clínicos. **Revista Del Instituto Nacional e Enfermedades Respiratorias do México**, v. 15, n. 2, p. 98-101, 2002.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; AROCH-CALDERÓN, A.; BAZÁN-MORA, E, CÓRDOVA-MARTÍNEZ, E. Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 47, n. 4, p. 145-148, 2004.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130- 139, 2006.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis,

leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CAZEDEY, E. C. L.; AZEVEDO, R. C. P.; SILVA, E. F.; ARAÚJO, M. B. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.

CHOTMONGKOL, V., K. METHAWASIN. Initial treatment with amphotericin B plus rifampin in the acute treatment of cryptococcal meningitis in aids. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 32, n. 4, p.776-8, 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, document **M38-A2**, 2008.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARA, L. M. C.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 44, n. 7, p. 631-639, 2006a.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; FECHINE, M. A.; COSTA, A. K.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. *In vitro* activities of caspofungin, amphotericin B and azoles against *Coccidioides posadasii* strains from Northeast, Brazil. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 21–26, 2006b.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; FECHINE, M. A.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 575–579, 2006c.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; MEDRANO, D. J.; MONTEIRO, A. J.; TAVARES, J. L.; LIMA, R. A.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 278-280, 2009.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; BANDEIRA, S. P.; FECHINE, M. A.; DE CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 65-72, 2010.

CORDEIRO, R. A.; MARQUES, F. J. F.; DA SILVA, M. R.; MALAQUIAS, A. D. M.; MELO, C. V. S.; MAFEZOLI, J.; OLIVEIRA, M. D. C. F.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C. Synthesis and antifungal activity in vitro of isoniazid derivatives against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 2504-2511, 2014.

COSTA, F. A.; REIS, R. C.; BENEVIDES, F.; TOMÉ, G. S.; HOLANDA, M. A. Coccidioidomicose pulmonar em caçador de tatus. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 27, n. 5, p. 275-278, 2001.

COX, R. A.; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 804-839, 2004.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 917–921, 2006.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115. 2010.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of Clinical Fungi, 2a edição, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Universitat Rovira i Virgili, Espanha, 2000.

DEUS FILHO Antônio. Chapter 2: Coccidioidomycosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 920-930, 2009.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115. 2010.

DICKSON, E. C., GIFFORD, M. A., San Joaquin Fever and fungus *Coccidioides*, **California & West. Med.**, 47:151, 1938.

DICAUDO DJ. Coccidioidomycosis: a review and update. **J Am Acad Dermatol**. 2006; 55(6):929-42.

DRUTZ, D. J.; CATANZARO, A. Coccidioidomycosis: state of the art. Part II. **American Review of Respiratory Disease**, v. 177, n. 3, p. 727-771, 1978.

EL-AZIZI, M. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-*albicans Candida spp.* by rifampicin and doxycycline. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 645–649, 2007.

ELIAS-COSTA, M. R. I.; NEGRONI, R.; GIMENO, S. R. Estudio biológico de un exoantígeno del *Coccidioides immitis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 9, p. 9-11, 1985.

EULALIO, K. D.; MACEDO, R. L.; CAVALCANTI, M. A. S.; MARTINS, L. M. S.; LAZERA, M. S.; WANKE, B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus*

- novemcintus*) in the state of Piauí, Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 149, n. 2, p. 57-61, 2000.
- FERREIRA, M. L.; BORGES, R. S.; NOGUEIRA, T. C. M.; ROCHA, L. C.; SOUZA, M. V. N. Tuberculose infantil: tratamento e problemas relacionados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 88, n. 1, p. 38-44, 2007.
- FERREIRA, M. L.; NOGUEIRA, T. C. M.; SOUZA, M. V. N. Problemas relacionados ao tratamento da tuberculose em pacientes com problemas hepáticos e renais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 88, n. 3, p. 125-131, 2007.
- FIANCHI, L.; PAGANO, L.; CAIRA, M.; NOSARI, A.; VAN LINT, M. T.; CANDONI, A.; OFFIDANI, M.; ALOISI, T.; IRRERA, G.; BONINI, A.; PICARDI, M.; CARAMATTI, C.; INVERNIZZI, R.; MATTEI, D.; MELILLO, L.; WAURE, C.; REDDICONTO, G. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study: Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 9, p. 1161-1170, 2007.
- FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 02, 2006.
- FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; SAN-BLAS, G.; NEGRONI, R.; ALVAREZ, I. G.; WANKE, B.; TAYLOR, J. W. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 98, n. 8, p. 4558-4562, 2001.
- FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; White, T. J.; TAYLOR, J. W. Molecular and phenotype description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 73-84, 2002.
- FISHER, B. T.; CHILLER, T. M.; PRASAD, P. A.; BEVERIDGE, M.; WALSH T. J.; ZAOUTIS T. E. Hospitalizations for Coccidioidomycosis at Forty-One Children's Hospitals in the United States. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 3, p. 243-247, 2010.
- GALGANI, J. N.; AMPEL, N. M.; BLAIR, J. E.; CATANZARO, A.; JOHNSON, R. H.; STEVENS, D. A.; WILLIAMS, P. L. Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1217-1223, 2005.
- GONZÁLEZ, G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Medical Mycology**, v. 47, p. 71-76, 2009.
- GREENE, D. R.; KOENIG, G.; FISHER, M. C.; TAYLOR, J. W. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 92, n. 3, p. 406-410, 2000.

- GREER, N. D. Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 20, n. 2, p. 188-196, 2007.
- HALL L.; OTTER J. A.; CHEWINS, J.; WENGENACK, N. L. Deactivation of the dimorphic fungi *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis* using hydrogen peroxide vapor. **Medical Mycology**, v. 46, n. 2, p. 189-191, 2008.
- HUNG, C. Y.; SESHAN, K. R.; YU, J. J.; SCHALLER, R.; XUE, J.; BASRUR, V.; GARDNER, M. J.; COLE, G. T. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6689-6703, 2005.
- HUNG, C. Y.; XUE, J.; COLE, G. T. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 225-235, 2007.
- JOHNSON, S. M.; SIMMONS, K. A.; PAPPAGIANIS, D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1982-1985, 2004.
- JUDGE, T. A. Core self-evaluations and work success. **Current Directions in Psychological Science**, v. 18, p. 58-62, 2009.
- JUDGE, V.; NARASIMHAN, B.; AHUJA, M.; SRIRAM, D.; YOGESHWARI, P.; DE CLERCQ, E.; PANNECOUQUE, C.; BALZARINI, J. Synthesis, antimycobacterial, antiviral, antimicrobial activities, and QSAR studies of isonicotinic acid-1-(substituted phenyl)- ethylidene/cycloheptylidene hydrazides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 1935-1952, 2012.
- KAPLANCIKLI, Z. A., TURAN-ZITOUNI, G., ÖZDEMİR, A., REVIAL, G. New triazole and triazolothiadiazine derivatives as possible antimicrobial agents. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 43, p. 155-159, 2008.
- KAUFFMAN CA. Endemic mycoses: blastomycosis, histoplasmosis, and sporotrichosis. **Infect Dis Clin North Am**. 2006b; 20(3):645-62.
- KREMER, M. Randomized evaluations of educational programs in developing countries: Some lessons, **American Economic Review Papers and Proceedings**, v. 93, n. 2, p. 102-115, 2003.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Coccidioidomycose. *In: Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 403-415.
- LANIADO-LABORÍN, Rafael. Coccidioidomycosis: Más que una enfermedad regional. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 19, n. 4, p. 301-308, 2006.

LANIADO-LABORIN, Rafael. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the Western hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 19-34, 2007.

LEDTKE, C.; REHM, S. J.; FRASER, T. G.; SHRESTHA, N. K.; TAN, C. D.; RODRIGUEZ, E. R.; TOMFORD, J. W.; JAIN, A.; LYTLE, B.; JOHNSTON, D.; SABIK, J.; GORDON, S. M.; DUIN, D. Endovascular infections caused by *Histoplasma capsulatum* a case series and review of the literature. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 136, p. 640-645, 2012.

LI, R.; CIBLAK, M. A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W.; MCGINNIS, M. R. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1734-1736, 2000.

LINDSLEY, M. D.; HURST, S. F.; IQBAL, N. J.; MORRISON, C. J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3505-3511, 2001.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MÉNDÉZ-TOVAR, L. J. Blastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 565-572, 2012.

MARTINEZ, Roberto. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARQUES, F. J. F. **Efeito inibitório das drogas antituberculose, antifúngica e análogos químicos da isoniazida frente a *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *in vitro***. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARQUES, F. J. F. **Efeito inibitório das drogas antituberculose frente a *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* spp. Síntese de análogos químicos, atividade antifúngica *in vitro* e mecanismo de ação**. 2013. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MASUNARI, A., TAVARES, L. C. Resumos do **XVII International Symposium on Medicinal Chemistry**, Barcelona, Spain, 2007.

MELNYK, B., DAVISON, S. Creating a culture of innovation in nursing education interdisciplinary partnerships, and positive deviance. **Nursing Administration Quarterly**, v. 33, n. 4, p. 288-295, 2009.

MEDRANO DJA. **Perfil de sensibilidade de cepas de *Coccidioides posadasii* a associação de drogas antimicrobianas**. Tese. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará. 2010.

MIRBORD-DONOVAN, F.; SCHALLER. HUNG, C.Y., XUE, J., REICHARD, U., COLE, G. T. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogens. **Infection and immunity**, v. 74, n. 1, p. 504-515, 2006.

MORAN, G. P.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drugs resistance in pathogenic fungi. *In*: Kavanagh K. (Ed.), **Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques**. USA: John Wiley & Sons Ltd., 2007. p. 93-113.

MUNOZ, B., CASTANON, L.R., CALDERON, I., VALQUEZ, M.E., MANJARREZ, M.E. Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in Mexican patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3.p.1247-1249, 2004.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. et al. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others infectious agents as cause external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, 245-249, 2002.

NOOR, O.; RAO, M.; RAO, B. K. An unusual case of coccidioidomycosis presenting with skin lesions. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 30, n. 5, p. 481-483, 2008.

ODDS, Frank C. Coccidioidomycosis: flying conidia and severed heads. **Mycologist**, v. 17, p. 37- 40, 2003a.

ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003b.

ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

PATOLE, J.; SANDBHOR, U.; PADHYE, S.; DEOBAGKAR, D. N.; ANSON, C. E.; POWELL, A. Structural chemistry and in vitro antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 51-55, 2003.

PEREIRA JUNIOR, H. R. J.; JORGE, W.; BAGAGLI, E. Por que tatu? **Ciência Hoje**, v. 34, n. 199, p. 70-73, 2003.

PETRIKKOS, G; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 108–117, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, A. S.; HOLLIS, R. J.; the SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852-856, 2002.

POLAK, A. *In vitro* and *in vivo* activity of antifungal agents in combination with fleroxacin, a new quinolone. **Mycoses**, v. 33, p. 173-178, 1990.

POSADAS, Alejandro. Un nuevo caso de mycosis fungoides com psorospermias. **Ann Circulo Medico Argentino**, v.15, n.9, p.585-597, 1892.

PROIA, L. A.; TENORIO, A. R. Successful use of voriconazole for treatment of *Coccidioides meningitis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2341, 2004.

RAHMAN, V. P. M.; MUKHTAR, S.; ANSARI, W. H; LEMIERE, G. Synthesis, stereochemistry and biological activity of some novel long alkyl chain substituted thiazolidin-4-ones and thiazan-4-one from 10-undecenoic acid hydrazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 173-184, 2005.

RESTREPO, Angela. *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore 1912) Almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al continente americano. **Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 30, n. 116, p. 367-386, 2006.

REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, M. K.; MENDES, C. C. B.; FARIA, A. R. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolilaryl-hidrazonas. **Química Nova**, v. 34, p. 76-81, 2011.

ROMERO, R. Revisão taxonômica de *Microlicia* sect. *Chaetostomoides* (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Botânica** 26: 429-435. 2009

ROSSINI, T. F.; GOULART, L. S. Histoplasmose clássica: revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.

SANGLARD, D., COSTE, A., FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1029–1050, 2009.

SAUBOLLE, Michael A. Laboratory aspects in the diagnosis of *Coccidioidomycosis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 301–314, 2007.

SAUBOLLE, M. A.; MCKELLAR, P. P.; SUSSLAND, D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of *coccidioidomycosis*. **Journal of clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 26-30, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; DA SILVA, L. C. I.; NUNES, J. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PAIXAO, G. C. L.ê nord-est Brésilien, région d'endémie de *coccidioidomycose*? A propos d'une microepidemie. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 7, n. 1, p. 37-39, 1997.

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

SILVA, L. C. L.; NUNES, L. M. A; SIDRIM, J. J. C; GONÇALVES, A. J. R. *Coccidioidomycose* pulmonar aguda: Primeiro surto epidêmico descrito no Ceará, segundo no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 72, n. 5, p. 49-66, 1997.

- SILVA, Penildo. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- SMITH, C. E., WHITING, E. G., BAKER, E. E., ROSENBERGER, H. G., BEARD, R. R., SAITO, M. T. The use of coccidioidina. **American Review of Tuberculosis**, v. 57, p. 330-360, 1948.
- STEWART, R. A.; MEYER, K. F. Isolation of *Coccidioides immitis* (stiles) from the soil. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 28, n. 1, p. 937-938, 1932.
- STEVENS, D. A.; RENDON, A.; GAONA-FLORES, V.; CATANZARO, A.; ANSTEAD, G. M.; PEDICONE, L.; GRAYBILL, J. R. Posaconazole therapy for chronic refractory coccidioidomycosis. **CHEST**, v. 132, n. 3, p. 952-958, 2007.
- SUTTON, Deanna A. Diagnosis of Coccidioidomycosis by culture - safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 315-325, 2007.
- TERZIOGLU, N.; GURSOY, A. Synthesis and anticancer evaluation of some new hydrazone derivatives of 2,6-dimethylimidazo[2,1-b]-[1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 781-786, 2003.
- TODESCHINI, A. R.; MIRANDA, A. L. E.; SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C.; BARREIRO, E. J. Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 189-199, 1998.
- UPPAL, G.; BALA, S.; KAMBOJ, S.; SAINI, M. Therapeutic review exploring antimicrobial potential of hydrazones as promising lead. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 1, p. 250-268, 2011.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.
- VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MALDONADO, A.; ALVAREZ-AULAR, A.; CAPPARELLI, M. V.; MURGICH, J. Synthesis, in vitro antifungal activity and mechanism of action of four sterol hydrazone analogues against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Steroids**, v. 76, p. 1069-1081, 2011.
- WANKE, B. Coccidioidomycose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, suppl IV, p. 375-378, 1994.
- WHEAT, L. J. Approach to the diagnosis of the endemic mycoses, **Clinics in Chest Medicine**, v.30.p.379-389,2009
- ZHANG, W., SMITH, C. Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. **Theoretical Applied Genetic**, v.84, p.813-820,1992.

ZHANG, Yang. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529-564, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A – VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA TODAS AS CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM O ANÁLOGO P3, ISONIAZIDA E ITRACONAZOL.

Cepas	C	2xCIM			CIM			CIM/2		
		P3	INH	ITC	P3	INH	ITC	P3	INH	ITC
01-06-088	29,54	14,42	10,21	3,38	19,38	12,83	12,04	23,67	16,67	13,17
01-06-089	29,83	7,04	11,54	6,92	12,42	13,79	9,21	15,96	14,58	15,67
01-06-090	26,13	15,21	11,04	2,40	21,63	11,29	10,71	25,92	12,08	14,63
01-06-092	26,96	16,13	10,42	2,33	21,54	11,75	9,79	21,79	11,67	15,25
01-06-101	30,58	24,63	7,96	6,92	27,08	14,00	10,21	28,88	15,29	17,25
01-06-102	29,25	24,13	8,96	8,00	25,83	14,75	10,54	27,04	15,08	17,29
01-06-103	31,75	17,58	7,96	6,17	17,79	14,00	9,50	19,88	15,29	17,08
05-02-064	29,42	13,71	9,50	2,57	18,67	12,46	8,79	21,96	15,83	14,25
05-02-066	30,67	14,88	9,79	5,91	19,25	12,46	9,71	19,42	15,75	14,17
05-02-069	29,92	14,92	9,79	5,91	19,29	12,46	9,71	21,75	15,71	14,00
05-02-070	29,29	17,50	12,96	6,33	18,00	13,54	13,71	18,88	14,54	14,17
05-04-012	26,83	17,46	13,08	6,13	17,50	15,46	13,08	21,21	20,63	15,46

Legenda - C: controle; P3: N^o 1-(4-methoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; INH: isoniazida; ITC: itraconazol.

APÊNDICE B - VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA TODAS AS CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM O ANÁLOGO P5, ISONIAZIDA E ITRACONAZOL.

Cepas	C	2xCIM			CIM			CIM/2		
		P5	INH	ITC	P5	INH	ITC	P5	INH	ITC
01-06-088	29,54	8,00	10,21	3,38	11,75	12,83	12,04	11,71	16,67	13,17
01-06-089	29,83	19,38	11,54	6,92	20,75	13,79	9,21	22,21	14,58	15,67
01-06-090	26,13	15,04	11,04	2,40	16,04	11,29	10,71	18,13	12,08	14,63
01-06-092	26,96	14,79	10,42	2,33	16,42	11,75	9,79	18,46	11,67	15,25
01-06-101	30,58	7,17	7,96	6,92	13,25	14,00	10,21	17,00	15,29	17,25
01-06-102	29,25	12,83	8,96	8,00	17,38	14,75	10,54	24,17	15,08	17,29
01-06-103	31,75	13,38	7,96	6,17	17,00	14,00	9,50	21,25	15,29	17,08
05-02-064	29,42	9,79	9,50	2,57	11,96	12,46	8,79	13,29	15,83	14,25
05-02-066	30,67	7,13	9,79	5,91	7,42	12,46	9,71	11,79	15,75	14,17
05-02-069	29,92	7,42	9,79	5,91	11,58	12,46	9,71	11,71	15,71	14,00
05-02-070	29,29	19,08	12,96	6,33	23,42	13,54	13,71	24,63	14,54	14,17
05-04-012	26,83	14,96	13,08	6,13	23,29	15,46	13,08	24,21	20,63	15,46

Legenda: C: controle; P5: N⁷- (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; INH: isoniazida; ITC: itraconazol.

APÊNDICE C - VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA TODAS AS CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM O ANÁLOGO P6, ISONIAZIDA E ITRACONAZOL.

Cepas	C	2xCIM			CIM			CIM/2		
		P6	INH	ITC	P6	INH	ITC	P6	INH	ITC
01-06-088	29,54	20,21	10,21	3,38	22,21	12,83	12,04	25,92	16,67	13,17
01-06-089	29,83	11,54	11,54	6,92	14,58	13,79	9,21	23,25	14,58	15,67
01-06-090	26,13	11,54	11,04	2,40	14,58	11,29	10,71	23,25	12,08	14,63
01-06-092	26,96	11,83	10,42	2,33	23,96	11,75	9,79	25,29	11,67	15,25
01-06-101	30,58	13,08	7,96	6,92	17,88	14,00	10,21	23,21	15,29	17,25
01-06-102	29,25	14,96	8,96	8,00	17,58	14,75	10,54	22,00	15,08	17,29
01-06-103	31,75	13,13	7,96	6,17	17,88	14,00	9,50	24,00	15,29	17,08
05-02-064	29,42	21,50	9,50	2,57	22,79	12,46	8,79	25,67	15,83	14,25
05-02-066	30,67	19,83	9,79	5,91	23,21	12,46	9,71	24,00	15,75	14,17
05-02-069	29,92	20,50	9,79	5,91	22,67	12,46	9,71	22,71	15,71	14,00
05-02-070	29,29	18,63	12,96	6,33	19,83	13,54	13,71	20,75	14,54	14,17
05-04-012	26,83	18,38	13,08	6,13	19,92	15,46	13,08	20,00	20,63	15,46

Legenda: C: controle; P6: N'-(1-(4-metilfenil)etilideno)isonicotinohidrazida; INH: isoniazida; ITC: itraconazol.

APÊNDICE D – VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA TODAS AS CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM O ANÁLOGO PACT, ISONIAZIDA E ITRACONAZOL.

Cepas	C	2xCIM			CIM			CIM/2		
		PACT	INH	ITC	PACT	INH	ITC	PACT	INH	ITC
01-06-088	29,54	9,92	10,21	3,38	11,42	12,83	12,04	15,21	16,67	13,17
01-06-089	29,83	11,21	11,54	6,92	15,04	13,79	9,21	17,58	14,58	15,67
01-06-090	26,13	17,29	11,04	2,40	17,63	11,29	10,71	18,00	12,08	14,63
01-06-092	26,96	17,38	10,42	2,33	17,71	11,75	9,79	17,71	11,67	15,25
01-06-101	30,58	12,08	7,96	6,92	13,17	14,00	10,21	24,04	15,29	17,25
01-06-102	29,25	12,63	8,96	8,00	13,38	14,75	10,54	25,17	15,08	17,29
01-06-103	31,75	12,08	7,96	6,17	14,42	14,00	9,50	22,21	15,29	17,08
05-02-064	29,42	8,29	9,50	2,57	10,79	12,46	8,79	14,79	15,83	14,25
05-02-066	30,67	10,46	9,79	5,91	11,25	12,46	9,71	14,46	15,75	14,17
05-02-069	29,92	9,92	9,79	5,91	10,29	12,46	9,71	14,83	15,71	14,00
05-02-070	29,29	6,17	12,96	6,33	11,04	13,54	13,71	12,50	14,54	14,17
05-04-012	26,83	8,42	13,08	6,13	10,17	15,46	13,08	10,42	20,63	15,46

Legenda: C: controle; PACT: N²- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; INH: isoniazida; ITC: itraconazol.

APÊNDICE E - VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA OITO CEPAS DE *C. posadasii* TATADAS COM O ANÁLOGO P3 COMBINADO COM ANTIFÚNGICOS ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B.

Cepas	C	2xCIM		CIM		CIM/2	
		P3+ ITC	P3 + AMB	P3 + ITC	P3 + AMB	P3 + ITC	P3 + AMB
01-06-090	38,79	8,71	9,13	9,08	14,42	15,67	15,79
01-06-103	42,21	8,88	10,75	9,50	13,92	20,50	19,75
05-04-012	36,79	11,79	10,96	16,13	14,00	24,13	18,13
05-02-070	41,25	10,17	11,54	17,75	13,29	17,83	18,46
01-06-088	41,42	8,96	10,00	17,50	15,13	17,42	18,67
05-02-064	45,79	10,88	10,67	17,58	15,38	17,88	18,71
01-06-101	40,63	10,96	10,75	17,58	13,42	17,54	19,38
01-06-089	47,79	10,13	10,04	17,50	15,79	17,79	18,08

Legenda: C: controle; P3: N²-(1-(4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol.

APÊNDICE F - VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA OITO CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM O ANÁLOGO P6 COMBINADO COM OS ANTIFÚNGICO ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B.

Cepas	C	2xCIM		CIM		CIM/2	
		P6 + ITC	P6 + AMB	P6 + ITC	P6 + AMB	P6 + ITC	P6 + AMB
01-06-090	38,79	11,83	11,08	17,21	13,21	17,54	13,21
01-06-103	42,21	14,79	11,63	17,63	13,46	17,96	13,88
05-04-012	36,79	14,54	11,54	16,88	14,21	17,38	13,54
05-02-070	41,25	15,38	12,92	17,29	12,79	17,71	14,75
01-06-088	41,42	15,63	11,54	16,71	13,63	17,58	12,92
05-02-064	45,79	15,50	10,17	17,33	13,21	18,00	14,54
01-06-101	40,63	16,25	12,50	17,58	13,83	17,54	14,67
01-06-089	47,79	14,04	12,71	16,63	13,42	17,58	14,00

Legenda: C: controle; P6: N'-(1-(4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol.

APÊNDICE G – VALORES BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ERGOSTEROL EM μM PARA OITO CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM O ANÁLOGO PACT COMBINADOS COM OS ANTIFÚNGICOS ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B.

Cepas	C	2xCIM		CIM		CIM/2	
		PACT + ITC	PACT + AMB	PACT + ITC	PACT + AMB	PACT + ITC	PACT + AMB
01-06-090	38,79	9,54	9,83	13,13	9,54	14,00	17,42
01-06-103	42,21	10,50	8,83	13,79	12,58	14,58	18,63
05-04-012	36,79	11,67	9,17	14,04	12,71	15,25	18,96
05-02-070	41,25	10,33	10,50	13,71	13,75	13,88	20,46
01-06-088	41,42	10,08	11,17	13,79	11,08	14,13	18,83
05-02-064	45,79	10,71	10,46	12,13	11,92	14,63	19,46
01-06-101	40,63	11,25	9,54	12,33	13,63	13,92	19,58
01-06-089	47,79	9,75	10,21	13,58	10,25	14,38	19,92

Legenda: C: controle; PACT: N^o - (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol; PACT: N^o- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida;

APÊNDICE H – VALORES BRUTOS DA ABSORBÂNCIA DO CONTEÚDO EXTRACELULAR PARA TODAS AS CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM OS ANÁLOGOS P3, P5, P6 E PACT, ISONIAZIDA E ANFOTERICINA B.

Cepas	C	260nm											
		CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2
		P3	P3	P5	P5	P6	P6	PACT	PACT	AMB	AMB	INH	INH
01-06-088	0,081	0,147	0,139	0,555	0,377	3	2,763	0,400	0,137	0,454	0,325	1,041	0,562
01-06-089	0,063	0,512	0,412	0,406	0,205	0,627	0,623	0,351	0,136	0,139	0,125	1,708	0,711
01-06-090	0,099	0,586	0,077	0,565	0,335	0,438	0,373	0,571	0,478	0,098	0,087	3	2,252
01-06-092	0,092	0,603	0,061	0,561	0,454	0,532	0,256	0,581	0,443	0,082	0,087	2,622	2,623
01-06-101	0,101	0,528	0,467	0,249	0,154	1,046	0,645	0,667	0,328	0,129	0,156	2,628	2,206
01-06-102	0,099	0,130	0,152	0,677	0,317	2,723	2,207	0,244	0,137	0,488	0,358	0,895	0,567
01-06-103	0,101	0,578	0,076	0,563	0,335	0,532	0,322	0,565	0,542	0,083	0,082	2,983	2,322
05-02-064	0,051	0,517	0,411	0,289	0,204	0,779	0,567	0,376	0,250	0,129	0,134	2,400	1,511
05-02-066	0,489	0,492	0,489	0,205	0,249	0,841	0,158	0,393	0,285	0,166	0,157	2,788	1,961
05-02-069	0,060	0,522	0,430	0,284	0,204	0,785	0,539	0,365	0,285	0,145	0,135	2,951	2,216
05-02-070	0,045	0,511	0,406	0,293	0,200	0,678	0,568	0,395	0,151	0,130	0,111	1,622	0,723
05-04-012	0,091	0,544	0,172	0,565	0,484	0,676	0,350	0,553	0,466	0,077	0,082	2,878	1,758

Legenda: C: controle; AMB: anfotericina B; PACT: N^o-(1- (4-feniletilideno) isonicotinohidrazida; P3: N^o (1-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N^o (1-m-tolileilidene) inohidrazida; P6: N^o (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida.

APÊNDICE I – VALORES BRUTOS DA ABSORBÂNCIA DO CONTEÚDO EXTRACELULAR PARA TODAS AS CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM OS ANÁLOGOS P3, P5, P6 E PACT, ISONIAZIDA E ANFOTERICINA B.

Cepas	C	280nm											
		CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2
		P3	P3	P5	P5	P6	P6	PACT	PACT	AMB	AMB	INH	INH
01-06-088	0,085	0,194	0,173	0,491	0,145	2,276	1,827	0,306	0,145	0,522	0,569	1,066	0,661
01-06-089	0,065	0,618	0,521	0,363	0,199	0,872	0,551	0,403	0,237	0,146	0,145	1,668	0,728
01-06-090	0,098	0,078	0,311	0,448	0,264	0,382	0,577	0,495	0,403	0,078	0,091	2,329	1,558
01-06-092	0,167	0,082	0,733	0,514	0,338	0,373	0,556	0,466	0,381	0,082	0,084	2,668	1,572
01-06-101	0,087	0,560	0,493	0,241	0,151	1,014	0,663	0,537	0,332	0,124	0,193	2,207	1,466
01-06-102	0,089	0,196	0,150	0,535	0,272	2,295	1,557	0,258	0,150	0,493	0,544	1,017	0,632
01-06-103	0,156	0,080	0,546	0,473	0,267	0,405	0,509	0,462	0,400	0,079	0,102	2,445	1,545
05-02-064	0,073	0,566	0,436	0,339	0,274	0,623	0,573	0,322	0,245	0,124	0,150	2,561	1,832
05-02-066	0,153	0,534	0,537	0,234	0,192	0,851	0,154	0,852	0,258	0,168	0,165	1,976	1,297
05-02-069	0,069	0,541	0,457	0,274	0,200	0,817	0,548	0,330	0,252	0,124	0,147	1,628	1,628
05-02-070	0,073	0,619	0,432	0,303	0,198	0,821	0,512	0,395	0,151	0,160	0,102	1,711	0,626
05-04-012	0,084	0,562	0,177	0,411	0,333	0,361	0,446	0,553	0,466	0,077	0,091	2,340	1,295

Legenda: C: controle; AMB: anfotericina B; INH: isoniazida; PACT: N⁷- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; P3: N⁷- (1- (4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N⁷- P5: (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N⁷- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida.

APÊNDICE J - VALORES BRUTOS DA ABSORBÂNCIA DO CONTEÚDO EXTRACELULAR DE OITO CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM OS ANÁLOGOS DA ISONIAZIDA EM COMBINAÇÃO COM O ANTIFÚNGICO ANFOTERICINA B.

Cepas	C	260nm															
		CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2
		PACT/ITC	PACT/ITC	PACT/AMB	PACT/AMB	P3/ITC	P3/ITC	P3/AMB	P3/AMB	P6/ITC	P6/ITC	P6/AMB	P6/AMB	AMB	AMB	INH	INH
01-06-103	0,093	0,138	0,116	0,183	0,161	0,751	0,723	0,379	0,402	0,396	0,397	0,363	0,362	0,139	0,125	1,708	0,711
05-04-012	0,087	0,119	0,134	0,187	0,139	0,659	0,674	0,306	0,371	0,372	0,301	0,356	0,324	0,098	0,087	3,345	2,252
05-02-070	0,108	0,127	0,128	0,151	0,139	0,771	0,732	0,372	0,399	0,428	0,306	0,367	0,367	0,129	0,156	2,628	2,206
01-06-088	0,091	0,135	0,156	0,193	0,149	0,668	0,783	0,375	0,461	0,375	0,403	0,346	0,345	0,083	0,082	2,983	2,322
05-02-064	0,095	0,156	0,135	0,232	0,134	0,658	0,773	0,398	0,350	0,351	0,327	0,444	0,355	0,129	0,134	2,400	1,511
01-06-101	0,082	0,136	0,111	0,176	0,151	0,659	0,667	0,429	0,355	0,390	0,265	0,447	0,343	0,130	0,111	1,622	0,723
01-06-089	0,109	0,131	0,138	0,166	0,1495	0,608	0,689	0,457	0,374	0,373	0,304	0,356	0,350	0,077	0,082	2,878	1,758

Legenda: C: controle; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol; PACT: N[']- (1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; P3: N['](1- (4-metoxifenil) etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N[']- (1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N[']- (1- (4-metilfenil) etilideno) isonicotinohidrazida.

APÊNDICE K - VALORES BRUTOS DA ABSORBÂNCIA DO CONTEÚDO EXTRACELULAR DE OITO CEPAS DE *C. posadasii* TRATADAS COM OS ANÁLOGOS DA ISONIAZIDA EM COMBINAÇÃO COM O ANTIFÚNGICO ANFOTERICINA B.

Cepas	C	280nm															
		CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2	CIM	CIM/2
		PACT/ITC	PACT/ITC	PACT/AMB	PACT/AMB	P3/ITC	P3/ITC	P3/AMB	P3/AMB	P6/ITC	P6/ITC	P6/AMB	P6/AMB	AMB	AMB	INH	INH
01-06-103	0,067	0,146	0,123	0,209	0,189	0,676	0,661	0,456	0,348	0,423	0,182	0,453	0,389	0,146	0,145	1,668	0,728
05-04-012	0,088	0,151	0,12	0,204	0,118	0,671	0,659	0,327	0,371	0,441	0,349	0,481	0,375	0,078	0,095	2,329	1,558
05-02-070	0,067	0,151	0,123	0,203	0,185	0,744	0,681	0,332	0,454	0,412	0,234	0,472	0,350	0,124	0,193	2,207	1,466
01-06-088	0,076	0,162	0,134	0,206	0,188	0,665	0,785	0,398	0,442	0,514	0,255	0,307	0,326	0,079	0,102	2,445	1,545
05-02-064	0,082	0,155	0,122	0,215	0,156	0,662	0,686	0,348	0,416	0,428	0,5115	0,422	0,371	0,12	0,150	2,561	1,832
01-06-101	0,071	0,134	0,121	0,259	0,203	0,424	0,246	0,402	0,520	0,424	0,246	0,428	0,372	0,160	0,102	1,711	0,626
01-06-089	0,087	0,151	0,149	0,203	0,187	0,612	0,703	0,366	0,425	0,409	0,239	0,462	0,398	0,077	0,091	2,340	1,295

Legenda: C: controle; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol; PACT: N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazida; P3: N'-(1-(4-metoxifenil)etilideno) isonicotinohidrazida; P5: N'-(1-m-tolileilidene) isonicotinohidrazida; P6: N'-(1-(4-metilfenil)etilideno) isonicotinohidrazida.