



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

**Atividade antifúngica *in vitro* de compostos naftoquinoidais contra cepas de
Candida tropicalis resistentes ao fluconazol**

Maria Adalgiza dos Santos Neta

**FORTALEZA – CEARÁ
2012**

Maria Adalgiza dos Santos Neta

Maria Adalgiza dos Santos Neta

**Atividade antifúngica *in vitro* de compostos naftoquinoidais contra cepas de
Candida tropicalis resistentes ao fluconazol**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

FORTALEZA – CEARÁ

2012

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

S237a Santos Neta, Maria Adalgiza dos.
Atividade antifúngica *in vitro* de compostos naftoquinoidais contra cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol / Maria Adalgiza dos Santos Neta. – 2012.
74 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre.

1. Naftoquinonas. 2. Fluconazol. 3. Candida Tropicalis. I. Título.

CDD 616.9041

Maria Adalgiza dos Santos Neta

**Atividade antifúngica *in vitro* de compostos naftoquinoidais contra cepas de
Candida tropicalis resistentes ao fluconazol**

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido (UFERSA)
Examinador

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará
Examinador

Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Dedico à Deus pela vida ,
ao meu esposo pelo amor e companheirismo, à
minha família pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela alegria de viver e ensinamentos de vida.

Ao meu esposo pela compreensão, carinho e apoio. Acima de tudo um grande companheiro.

À minha família, minha mãe e irmã pela compreensão e pelo imenso carinho que sempre me deram, mesmo apesar da distância e da saudade.

A todos familiares, meus sogros e amigos que apoiaram e acreditaram na minha dedicação e no meu esforço.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela orientação na realização deste presente trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Danielle Silveira Macêdo que contribuiu de uma forma muito especial para que fosse possível a concretização desse dia.

Ao prof. Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior por todo o apoio em isolar e ceder as moléculas utilizadas no presente trabalho.

Ao Dr. Bruno Côelho Cavalcanti pela dedicação e colaboração na parte experimental do presente trabalho e na etapa de realização da Citometria de Fluxo.

Ao Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães pelo apoio e dedicação na etapa de realização da Citometria de Fluxo, a qual foi fundamental para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro e a doutoranda Marina Lobo pelo apoio e colaboração na parte experimental (biologia molecular) do presente trabalho.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia: Cecília Rocha da Silva, João Batista de Andrade Neto, Rosana de Souza Campos, Janaína Siebra, Rose Silva , pelas experiências compartilhadas ao longo desses dois anos.

“Às vezes só o tempo nos diz o quanto somos fortes e felizes, só os sonhos nos mostram que ter ideais e buscá-los é uma forma de sermos donos das nossas próprias conquistas”

Maria Adalgiza dos Santos Neta

RESUMO

A incidência de infecções oportunistas causadas por fungos, com destaque para as leveduras do gênero *Candida* vem aumentando substancialmente. Estudos relatam que tem sido observado um notável crescimento de infecções por espécies não *albicans* (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*). Isolados clínicos resistentes aos azólicos, em especial ao fluconazol, são cada vez mais relatados. As naftoquinonas são uma importante classe de moléculas biologicamente ativas, apresentando atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antipirética, anticancerígena e tripanocida e tem sido amplamente testadas em vários estudos farmacológicos. Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância em processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. O presente trabalho buscou avaliar e comparar o efeito antifúngico de naftoquinonas frente a cepas de *Candida tropicalis* resistentes e sensíveis ao fluconazol, utilizando diferentes técnicas tais como métodos de microdiluição em caldo, procedimentos de citometria de fluxo e ensaio do Cometa. Utilizamos sete cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol para esse estudo, as quais foram isoladas de sangue e faziam parte da coleção de leveduras do Laboratório de Bioprospecção Experimental em leveduras (LABEL), afiliado com a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará . Foi utilizado três compostos de naftoquinonas frente à 07 cepas de *Candida tropicalis* e foram submetidas aos testes de Sensibilidade *in vitro* , onde apresentaram uma potente atividade antifúngica. Através da Citometria de Fluxo, foi possível avaliar alterações morfológicas e de integridade da membrana significativas desses compostos frente às cepas, além de disfunção mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio. Através do ensaio do Cometa foi possível encontrar danos significativos ao DNA. Em síntese, os resultados sugerem que estes compostos podem ser usados como agentes antifúngicos para o tratamento de candidemias.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Naftoquinonas. Atividade Antifúngica

ABSTRACT

The incidence of opportunistic infections caused by fungi, with emphasis on *Candida* species has increased substantially. Studies report that there has been a notable increase of infections by non-albicans species (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei*). Clinical isolates resistant to azoles, particularly fluconazole, are increasingly reported. The naphthoquinones are an important class of active molecules biologically presenting antibacterial, antifungal, antiviral, antiinflammatory, antipyretic, anti-cancer and trypanocidal and has been tested extensively in several pharmacological studies. In recent years intensified the interest in in this substances, not only due to your importance in vital biochemical processes as well as the increasing emphasis that they show in various pharmacological studies. This study aimed to evaluate and compare the effect of antifungal naphthoquinones against strains of *Candida tropicalis* resistant and susceptible to fluconazole, using different techniques such as broth microdilution methods, procedures Flow Cytometry procedures and Comet assay. We use seven strains of *Candida tropicalis* resistant to fluconazole for this study, which were isolated from blood and were part of the collection of yeasts Experimental Laboratory Bioprospecting in yeast (LABEL), affiliated with the Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceará. We used three compounds of naphthoquinones against the seven strains of *Candida tropicalis* and were subjected to in vitro sensitivity tests, which showed an antifungal activity potent. Through Flow Cytometry, it was possible to assess morphological changes and membrane integrity of these compounds fronts to significant strains in addition to mitochondrial dysfunction and production of reactive oxygen species. Through the Comet assay was possible to find significant damage to DNA. In summary, the results suggest that these compounds may be used as antifungal agents for the treatment of candidemia.

Key-words: *Candida tropicalis*. Naphthoquinones. Antifungal activity

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Via sintética utilizada para obter os compostos 1-3 13

Figura 2. Resumo esquemático do ciclo redox das quinonas 14

ARTIGO

Figura 1. Síntese dos compostos de naftoquinonas 1,2 e 3. 53

Figura 2. Análise por citometria de fluxo para avaliação do efeito sinérgico do com fluconazol (64µg/mL); com (128µg/mL) dos compostos de naftofuranquinonas (NFQ's) 1, 2 e 3 em isolados de *C.tropicalis* FLC-resistente, 54 por um período de 24 horas, para avaliar redução no número de células. *P<0.05 em relação ao controle por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls.

Figura 3. Análise dos danos morfológicos (FSC x SSC) e efeito na integridade da membrana (determinado pelo teste de exclusão do PI) para avaliação do efeito da atividade do fluconazol (64µg/mL); com Anfotericina (4µg/mL); com 55 compostos de naftofuranquinonas (NFQ's) 1, 2 e 3 (128 µg/mL) (**A**) em isolados de *C.tropicalis* fluconazol-resistente (**B**) , por um período de 24 horas. *P <0.05 em relação ao controle por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls.

Figura 4. Avaliação da formação de EROS em isolados de *C.tropicalis* fluconazol-sensível (**a**) e fluconazol-resistente (**b**) não tratados e isolados de *C.tropicalis* fluconazol-sensível (**c**) e fluconazol-resistente (**d**) após o tratamento com os compostos naphthofuranquinones (NFQ's) 1, 2 e 3 (128 µg/mL) (**A**), por um 56 período de 24 horas. Percentual de formação de ROS em isolados de *C.tropicalis* fluconazol-sensível (**B**) e fluconazol-resistente (**C**), por um período de 24 horas. *P<0.05 em relação ao controle por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls.

Figura 5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de *C. tropicalis* fluconazol-resistente. As células foram marcadas com Rh123 (50 nM). O gráfico

mostra a cepa incubada com RPMI (controle), com FLC (64 µg/mL), com Anfotericina (2µg/mL) e com os compostos naftofuranquinonas (NFQ's) 1, 2 e 3 (128 µg/mL) por 24 horas. *P<0.05 em relação ao controle por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls 57

Figura 6. Efeitos da anfotericina (4µg/mL), compostos naftofuranquinonas (NFQ's) 1, 2 e 3 (128 ng / mL) no índice de dano ao DNA e lesões oxidativas do DNA, durante 24 horas, utilizando o ensaio cometa-versão alcalina do e a versão modificada do ensaio cometa, na presença ou na ausência de enzimas FPG, em estirpes de *C. tropicalis* resistentes a FLC. * P <0,05 em relação ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos de naftoquinonas utilizados no estudo	12
Tabela 2. Efeito dos compostos de naftofuranquinonas 1, 2 e 3 contra cepas de <i>C. tropicalis</i> fluconazol- resistente (MIC 50%-48H)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- DCFH – Diclorofluoresceína
- DCF – 2,7-Diclorofluoresceína
- DMSO – Dimetilsufóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- FDA – Food and Drug Administration
- FPG – Formamidopirimidina- DNA glicosilase
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- LIPs – Lipases
- NaOH – Hidróxido de sódio
- NCI – Instituto Nacional do Câncer
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PBS – Tampão fosfato salina
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- Saps – Aspartil Proteinases
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.	Infecções Fúngicas.....	01
1.2	Incidência de Infecções Fúngicas Invasivas	01
2.	<i>Candida tropicalis</i> : um microorganismo emergente.....	03
3.	Resistência aos Azólicos (Fluconazol).....	07
3.1	Método de Detecção de Resistência.....	09
4.	Produtos Naturais como fonte de fármacos.....	10
4.1.	Naftoquinonas.....	11
2.1	PERGUNTAS DE PARTIDA.....	19
3	HIPÓTESES.....	20
4	OBJETIVOS.....	21
4.1	Objetivo Geral.....	21
4.2	Objetivos Específicos.....	21
5	CAPÍTULO 1.....	22
6	CONCLUSÕES.....	44
7	PERSPECTIVAS.....	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	ANEXO I.....	53
	ANEXO II.....	60
	ANEXO III.....	61

INTRODUÇÃO

1. INFECÇÕES FÚNGICAS

Nas últimas décadas diversos fatores relacionados com o avanço da medicina, como a introdução de novas técnicas diagnósticas e invasivas, a maior eficácia nas técnicas de transplantes e o uso de agentes imunossupressores e quimioterápicos têm sido responsabilizados pelo aumento de sobrevivência dos pacientes (SCHMALRECK *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012). Contudo, a incidência de infecções oportunistas causadas por fungos, com destaque para as leveduras do gênero *Candida* vem aumentando substancialmente, as quais podem se apresentar causando infecções superficiais ou invasivas, com envolvimento de um ou múltiplos órgãos (SILVA *et al.*, 2012).

O aumento da incidência das infecções fúngicas invasivas deve-se, em grande parte, ao aumento significativo da população de doentes considerada de risco, a qual inclui doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana, doentes neoplásicos ou transplantados, sujeitos a quimioterapia e/ou terapia imunossupressora, uso de antimicrobianos de amplo espectro e em particular ao emprego de uma medicina mais intervencionista na qual se aplica técnicas de suporte à vida e ao uso de diferentes métodos diagnósticos e terapêuticos (cateteres intravasculares, cirurgia e nutrição parenteral) (CHAGAS-NETO *et al.*, 2009)

As infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida* spp. resultam do aumento do tempo de internação e juntamente com as despesas médicas constituem um importante problema de saúde pública, principalmente em centros médicos terciários. São caracterizadas por serem de evolução grave, rapidamente progressiva, com elevada taxa de mortalidade (50%) e de diagnóstico difícil (CHOU *et al.*, 2007 ; NUCCI & COLOMBO, 2007; SCHMALRECK *et al.*, 2012).

1.1 Incidência de Infecções Fúngicas Invasivas

Desde o início da década de 80 que os fungos têm emergido como agentes patogênicos, especialmente em doentes hospitalizados e imunocomprometidos. Um estudo realizado por Martin *et al.* (2003) revelou que a taxa de sepse causada por microorganismos fúngicos aumentou 207% entre os anos de 1979 a 2000, nos Estados Unidos.

Candida spp. é uma comensal da mucosa humana e manteve-se como a quarta causa mais importante de infecção da corrente sanguínea nosocomial, responsável por 8 a 10% de todas as infecções da corrente sanguínea adquiridas em hospitais. Mais de 200 espécies de *Candida* têm sido descritas, mas 95% de todas as infecções por *Candida* são causadas por apenas cinco espécies: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. albicans* (VOLLMEI *et al.*, 2008).

Na Espanha, em um estudo conduzido em 44 hospitais terciários, um total de 1.367 episódios de fungemia foram relatados. A incidência foi de 0.92 por 1.000 internações. *Candida albicans* foi a mais isolada (0.41 episódios/1000 admissões) seguida por *C.parapsilosis sensu stricto* (0.22) (PEMÁN *et al.*, 2012).

Na Suíça, foi realizado um estudo de vigilância entre 1991 a 2000 em 17 hospitais universitários e seus hospitais filiados, que representavam em sua totalidade 79% de todos os hospitais terciários deste país. Observou-se *Candida* spp. como a sétima causa de infecções da corrente sanguínea correspondendo a 2,9% dos isolados de hemoculturas, sendo que sua incidência permaneceu inalterada durante os 10 anos do estudo, 5,4 casos/100.000 habitantes (MARCHETTI *et al.*, 2004).

Na América Latina, um estudo realizado por Godoy *et al.* (2003) publicaram um estudo envolvendo 5 instituições de 4 países (Venezuela, Peru, Argentina e Brasil) por um período de 12 meses. Nesta ocasião foram isoladas de hemoculturas 103 cepas de 6 diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans* foi detectada em 42,0% dos casos, *C. tropicalis* em 24,2%, *C. parapsilosis* 21,2%, *C. glabrata* 7,7%, *C. guilliermondii* 2,9% e *C. lusitaniae* 1,9%. As espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam por 58% das ocorrências.

No Brasil, um estudo observacional, prospectivo, de base laboratorial, conduzido por Hinrichsen *et al.* (2008) em um Hospital do Recife mostrou que a taxa de incidência de candidemia foi de 3,9 episódios por 1.000 admissões. As espécies não-*albicans* representaram mais de 50% dos casos, predominando *Candida parapsilosis* (33%) e *Candida tropicalis* (24%). Já em outro estudo conduzido em um Hospital Universitário de Londrina por um período de três anos, mostrou que infecções por *Candida albicans* foi a mais freqüente, mas outras espécies de *Candida* corresponderam a 64% dos isolados, incluindo predominantemente *Candida tropicalis* (33,2%) e *Candida parapsilosis* (19,2%) (FURLANETO, *et al.*, 2011).

Particularmente no Estado do Ceará, um estudo realizado por Mendrano *et al.*, (2006) analisou 50 culturas de origem sanguínea e mostrou que a espécie mais

comumente isolada foi a *C.parapsilosis* (n=18), seguida por *C.albicans* (n=14), *C.tropicalis* (n=8), *C.guilliermondii* (n=6), *C.glabrata* (n=2) e *Candida* spp. (n=2).

A epidemiologia das infecções fúngicas invasivas (IFIs) está mudando, *Candida albicans* continua sendo a levedura mais importante, no entanto, um notável crescimento de infecções por espécies não *albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) tem aumentado e corresponde a 36-63% de todos os casos. (CHI, *et al*, 2011;GAMARRA, 2010).

No Brasil, a *C. tropicalis* é um agente frequente de candidemia em hospitais, sendo a segunda espécie mais comumente isolada (NUCCI & COLOMBO, 2007), como também pouco estudada no Ceará (MENEZES, *et. al.*, 2009).

2. CANDIDA TROPICALIS: UM MICRORGANISMO EMERGENTE

2.1 Microbiologia

Reconhecida primeiramente como *Oidium tropicale*, foi diferenciada entre as mais diversas espécies de *Candida* em 1910 por Aldo Castellani, um patologista e bacteriologista italiano. Mas foi somente em 1923 que Christine Marie Berkhout introduziu o nome atual, *Candida tropicalis* (NEGRI *et al.* 2012).

É uma levedura diplóide pertencente à divisão *Ascomyceta* e é um agente patogênico oportunista humano, que coloniza vários sítios anatômicos distintos, incluindo a pele, trato gastrointestinal e geniturinário podendo também ser encontrado no trato respiratório. Pode também ser recuperada a partir do meio ambiente, especialmente de superfícies médicas. As infecções fúngicas graves causadas por esta espécie datam desde a década de 60. Entre as infecções invasivas causadas por *C. tropicalis*, as mais comuns são candidúria, candidemia (NEGRI *et al.* 2012).

2.2 Identificação

Macroscopicamente, em ágar Sabouraud dextrose, as colônias de *C.tropicalis* apresentam-se com coloração creme com uma borda ligeiramente micelial e com coloração azul escuro em CHROMagar *Candida*™. Microscopicamente, em ágar Corn Meal Tween 80, a 25°C, após 72h, apresenta blastoconídeos isolados ou em pequenos grupos ao longo de toda a pseudohifa possuindo a capacidade de produzir hifas

verdadeiras. Em testes bioquímicos esta levedura difere das outras espécies por ser capaz de fermentar e assimilar sacarose, glucose, galactose, trealose e maltose, mas não a lactose ou rafinose. Geneticamente, *C. tropicalis* tem mais similaridade com *C. albicans* do que quando comparadas com a *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Para a identificação molecular, métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e os ensaios de PCR em tempo real estão sendo utilizados com sucesso para identificar *C. tropicalis* a partir de amostras clínicas, porém estes métodos ainda não estão padronizados ou prontamente disponíveis nos laboratórios clínicos (NEGRI *et al.* 2012; SILVA *et al.*,2012).

2.3 Fatores de Risco

De um modo geral, os fatores de risco associados ao desenvolvimento de infecções adquiridas no hospital por *Candida* estão associados com: longos períodos em UTIs, a administração de antibióticos de largo espectro, pacientes com imunossupressão, ventilação mecânica, candidúria, queimaduras e hemodiálise (NEGRI *et al.* 2012).

Estudos têm mostrado que infecções causadas por *C. tropicalis* são menos prováveis de ocorrer entre as crianças de menos de um ano de idade, mas é mais provável de ocorrer em pacientes com câncer ou neutropenia e está fortemente associada com a presença de biofilmes em cateteres urinários (SILVA *et al.*,2012). Estudos adicionais sugeriram que *C. tropicalis* está associada com maior potencial de disseminação e mortalidade em pacientes internados em UTI, principalmente em pacientes oncológicos do que *C. albicans* ou qualquer outra espécie não *albicans* (NEGRI *et al.* 2012).

2.4 Fatores de Virulência e Patogenicidade

A patogenicidade de espécies de *Candida* é mediada por um número de fatores de virulência que interagem diretamente com as células hospedeiras causando danos, incluindo a adesão e formação de biofilmes no tecido do hospedeiro, bem como dispositivos médicos, produção de hifas e de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemólise) (KOTHAVADE *et al.*, 2010). Espécies de *Candida* podem colonizar e causar a doença em vários sítios anatômicos distintos, incluindo a pele,

cavidade oral, trato gastrointestinal, sistemas genitourinário e vascular. A fim de estabelecer a infecção, patógenos oportunistas tem que evitar o sistema imunitário, sobreviver, reproduzir no ambiente hospedeiro, e, no caso de infecção sistêmica, disseminar a novos tecidos e órgãos (SILVA *et al.*,2012).

A formação de biofilme é iniciada quando a levedura adere a uma superfície e as células começam a se fixar umas às outras e a se proliferar conduzindo à formação de um grande biofilme maduro e estruturado, composto de uma grande matriz extracelular que funciona como uma barreira contra células fagocíticas. Além disso, estudos indicam que os biofilmes de *C. tropicalis* apresentam grandes quantidades de material de matriz completamente resistentes aos antifúngicos. Além disso, biofilmes formados por espécies não *albicans* têm sido associados com maior morbidade e mortalidade em comparação com os isolados não formadores de biofilmes. Supõe-se que a formação de biofilmes maduros e a subsequente produção de matriz extracelular é fortemente dependente da espécie, estirpe e das condições ambientais (pH, composição do meio, oxigênio) (SILVA *et al.*,2012).

As hifas têm um papel importante na invasão do tecido, e a investigação *in vitro* demonstrou que a falta de formação de hifas por espécies de *Candida* torna essas espécies com uma capacidade menor de invadir os tecidos em comparação as espécies formadoras de hifas (SILVA *et al.*,2012).

Alguns autores formularam a hipótese que a formação de hifas permite além de um acréscimo na capacidade de invasão das células hospedeiras, a indução de citotoxicidade e/ou aumento da resistência à fagocitose (FELK *et al.*, 2002).

A destruição de tecidos do hospedeiro por espécies de *Candida* pode ser facilitada pela liberação de enzimas hidrolíticas. Dentre as enzimas mais frequentemente implicadas na patogenicidade de espécies de *Candida* podemos destacar: Aspartil Proteinases (Saps), fosfolipases, lipases (LIPs) e hemolisinas.

As Saps tratam-se de antígenos imunodominantes que conferem virulência a *Candida* spp., degradando diversas proteínas humanas, como albumina, hemoglobina e imunoglobulina A. Essa atividade proteolítica, que pode ocorrer a diferentes pHs, foi relacionada com a capacidade de invasão tecidual de *Candida albicans*. Estudos *in vitro* demonstraram que os genes SAPs1-3 são expressos pelas formas leveduriformes, enquanto os genes SAPs 4-6 são expressos por fungos com hifas (BARELLE *et al.*, 2008; FELK *et al.*, 2002) Outras espécies não *albicans* como *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*

também expressam proteínases. *C. tropicalis* possui os genes SAP1-4, enquanto *C. dubliniensis* apresenta 7 proteínases (com elevada homologia às proteínases de *C. albicans*) já identificadas (YANG, 2003).

Fosfolipases são enzimas que hidrolisam as ligações ésteres presentes nos fosfolípidos. Estas enzimas correlacionam-se com um aumento de virulência e foram classificadas em diversas classes (A, B, C ou D) de acordo com o éster que clivam (YANG, 2003). A produção de todas as classes de fosfolipases foi descrita para as espécies de *Candida* e contribuem para causar dano à membrana celular do hospedeiro, bem como facilitar o processo de adesão. Vários estudos indicam que as espécies não *albicans* produzem fosfolipases extracelulares, mas com menor significância quando comparados aos de *C. albicans*. As fosfolipases B possuem grande relevância no gênero *Candida*, sendo expressas por outros gêneros como *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009).

As lipases são enzimas envolvidas na hidrólise de triacilgliceróis. Em *C. albicans*, 10 genes que codificam as lipases já foram identificados. No entanto, não foram realizados estudos para investigar o papel destes genes de virulência em cepas de *C. tropicalis* (SILVA *et al.*, 2012).

Microorganismos patogênicos podem crescer no hospedeiro usando o heme ou a hemoglobina como fonte de ferro. As hemolisinas são usadas por espécies de *Candida* para degradar hemoglobina. Assim, estas são consideradas fatores de virulência chave que permite a sobrevivência e a persistência de patógenos no hospedeiro. *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são todas capazes de produzir hemólise *in vitro*, induzindo lise parcial ou total de eritrócitos, embora a extensão desse dano é dependente da espécie (NEGRI *et al.* 2012; SILVA *et al.*, 2012).

3. RESISTÊNCIA AOS AZÓLICOS (FLUCONAZOL)

Resistência é um fenômeno que ocorre *in vivo*, e pode estar ou não associada à falha terapêutica. Fatores relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica do antifúngico, bem como aqueles relacionados ao hospedeiro e à espécie causadora da infecção, estão envolvidos nas diferenças que existem entre susceptibilidade *in vitro* e resposta clínica ao tratamento (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

O fluconazol surgiu no início da década de 90 como o primeiro agente antifúngico triazólico aprovado pela FDA para o tratamento de infecções sistêmicas

causadas por *Candida* (PFALLER & DIEKEMA, 2010). É bem tolerado e é um agente seguro que tem boa atividade clínica contra *Cryptococcus neoformans* e a maioria dos isolados de *Candida spp.* O uso aumentado desta droga deu origem ao desenvolvimento de resistência a *Candida spp.*, principalmente em isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* (KOTHAVADE *et al.*, 2010)

Os fármacos pertencentes a esta classe terapêutica possuem atividade contra o citocromo P-450 fúngico, através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase. Esta enzima permite a conversão do lanosterol em ergosterol, e a sua inibição interrompe a síntese da membrana celular na célula fúngica. Estes agentes ainda influenciam em uma etapa posterior da síntese do ergosterol, através da inibição da Δ^{20} dessaturação (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

Os relatos de resistência aos azólicos têm uma posição de liderança em publicações. O uso excessivo de azólicos (especialmente fluconazol) em tratamentos de pacientes HIV-positivos com infecções fúngicas nas mucosas no período anterior à introdução da terapia antiretroviral tem favorecido a aquisição de resistência aos azólicos de vários fungos patogênicos. Estas são as principais espécies de *Candida* relacionadas, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, e menos frequentemente espécies de *Cryptococcus* (SANGLARD, 2002). Entre as espécies não *albicans*, *C. tropicalis* é a segunda espécie mais comumente isolada (KOTHAVADE *et al.*, 2010). Esta levedura normalmente permanece suscetível a antifúngicos poliênicos, mas frequentemente é resistente aos análogos da pirimidina, representado pela flucitosina. No entanto, os isolados clínicos resistentes aos azólicos, em especial ao fluconazol, são cada vez mais relatados (VANDEPUTTE, *et al.*, 2005; KOTHAVADE *et al.*, 2010).

Três principais mecanismos de resistência são normalmente descritos: (i) alteração do citocromo P450 na proteína ERG11, onde esta é responsável pela demetilação do lanosterol e é uma importante enzima da biossíntese do ergosterol. A expressão excessiva de ERG11 resulta na produção em massa de enzima, criando, por outro lado, necessidade de uma concentração superior de fluconazol a nível intracelular. Obviamente, este evento conduz a uma diminuição da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase (ii) alterações em etapas específicas da biossíntese do ergosterol e (iii) alteração no efluxo da droga no qual a perda de droga no interior celular acontece através de transporte ativo e é mediada através da glicoproteína P ou por outras proteínas como MFS (principal superfamília facilitadora). Estes três mecanismos podem

ser encontrados separadamente, mas eles também podem ser combinados, contribuindo assim para a aquisição de resistência aos azólicos (SANGLARD, 2003; CUENCA-ESTRELLA, 2010).

O aumento do uso global de fluconazol em várias condições clínicas (candidíase) é a maior causa de dominância de espécies não *albicans* em relação a *C.albicans*. Portanto, algumas medidas para tentar controlar o aparecimento de espécies resistentes na prática clínica devem ser tomadas, como: aplicação terapêutica de fluconazol deve ser limitado a pacientes de alto risco para minimizar aparecimento da resistência; pacientes com candidíase recorrente que foram tratados recentemente com fluconazol, não devem ser tratados novamente com o mesmo fármaco; utilização de vários agentes antifúngicos e suas interações com outros medicamentos precisam ser cuidadosamente pensado antes da sua aplicação clínica em pacientes de alto risco; nos pacientes cirúrgicos, novos agentes antifúngicos como os azóis (voriconazol) e equinocandinas são opções terapêuticas menos tóxicas para prevenção e terapia de infecções por *Candida* e o aumento do conhecimento dos fatores de risco para espécies não *albicans* pode fornecer orientações para escolhas apropriadas de tratamento antifúngico (KOTHAVADE *et al.*, 2010).

3.1. Métodos de Detecção de Resistência

O desenvolvimento de métodos para avaliar susceptibilidade a antifúngicos tem sua história vinculada aos avanços obtidos na quimioterapia antibacteriana. Com o surgimento de espécies patogênicas com resistência intrínseca aos antifúngicos, tem aumentado a necessidade de desenvolvimento e padronização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002).

Mundialmente, estudos de vigilância de resistência a antifúngicos mostram a emergência de leveduras de *Candida* não *albicans* como causa de infecções superficiais e invasivas, sendo que muitas destas espécies apresentam menor susceptibilidade a anfotericina-B e/ou azólicos. Diante disso, aumentou o interesse da comunidade científica no aperfeiçoamento de testes de susceptibilidade para auxiliar na escolha mais adequada na terapêutica antifúngica como também, da indústria farmacêutica para utilizar essa ferramenta no desenvolvimento de novas drogas (REX *et al.*,2001; ALMIRANTE *et al.*, 2005).

Nos anos 90, tentou-se padronizar testes de sensibilidade antifúngica para leveduras para a obtenção de resultados rápidos, confiáveis e reprodutíveis que pudessem ser usados no monitoramento terapêutico. A publicação de documento M27-A (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) foi um importante passo para a realização desses objetivos. Padronizaram-se os métodos de macro e microdiluição em caldo para os testes de sensibilidade de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* e definiu-se a interpretação de CIM (concentração inibitória mínima) para avaliar a eficácia da 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol frente a cepas de *Candida* spp (REX et al., 2001; CLSI, 2008).

A citometria de fluxo tem sido há muito tempo reconhecida como uma possível ferramenta para testes de susceptibilidade antifúngica onde pesquisas concentram-se principalmente no gênero *Candida* e *Saccharomyces* (REX, et al., 2001).

Trabalhos têm explorado essa possibilidade e mostrou o potencial dessa técnica em relação ao método de referência (microdiluição em caldo). Um estudo sugeriu que essa técnica pode ser especialmente útil para a detecção da resistência a anfotericina B (REX, et al., 2001). Além disso, os estudos de biologia de leveduras estão focando especificamente no que diz respeito à elucidação dos mecanismos celulares e moleculares de resposta à agentes citotóxicos (CÔRTE-REAL et al, 2002 ; PINA-VAZ & RODRIGUES, 2010).

4. PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE FÁRMACOS

O uso dos vegetais como medicamento é quase tão antigo quanto à existência do ser humano na terra. Apesar da grande diversidade de plantas existentes no planeta a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, sendo somente cerca de 5% das espécies conhecidas estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor avaliada sob os aspectos biológicos. Nesse sentido, o Brasil tem uma destacada biodiversidade, possuindo uma das mais ricas floras do mundo. O país detém cerca de 20% de toda a biodiversidade do planeta, com valor superior a duzentas mil espécies de plantas, animais e microrganismos já registradas e o número pode atingir a 1,8 milhões de espécies (CALIXTO, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial usa medicamentos tradicionais para tratar doenças infecciosas e não infecciosas, e a maioria são oriundas de plantas e/ou seus produtos.

As moléculas bioativas que foram obtidas a partir de diversos recursos naturais, incluindo microrganismos terrestres e marinhos, plantas e animais (invertebrados e vertebrados) e seus derivados, foram validados por suas potenciais propriedades antifúngicas. Esses compostos antibióticos por serem não tóxicos ou menos tóxicos para as células hospedeiras apresentam um papel vital no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012).

Os principais grupos de compostos com atividade antimicrobiana, incluem: alcalóides, taninos, flavonóides, quinonas, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, ácidos fenólicos e os óleos essenciais que normalmente apresentam atividade contra *C. albicans*, incluindo também espécies emergentes de *Candida* não *albicans* (RAJESHKUMAR & SUNDARARAMAN, 2012).

Dentre esses compostos, destacam-se as substâncias naftoquinoidais que são intensamente estudadas por apresentarem diferentes bioatividades e por ter seu perfil biológico intimamente relacionado com a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio e intercalar o DNA (TONHOLO *et al.*, 1998).

4.1 Naftoquinonas

As quinonas representam uma ampla e variada família de compostos orgânicos de distribuição natural. São uma classe de compostos orgânicos, cujas propriedades químicas permitem que elas interajam com alvos biológicos, formando ligações covalentes e, agindo como agentes de transferência de elétrons em reações de oxidação-redução. (DA SILVA *et al.*, 2003; KUMAGAI, *et al.*, 2011).

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas - um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular. Em decorrência de diferentes arranjos quinonoídicos (isomeria), com um mesmo tipo de anel pode-se ter, dependendo das disposições relativas das carbonilas, diferentes quinonas. Por exemplo, no arranjo de base naftalênica tem-se a forma isomérica 1,2 ou *orto*-quinonoídica, quando as carbonilas são vizinhas, ou a 1,4, *para*-quinonoídica, com as carbonilas tendo entre si dois carbonos. Outros arranjos isoméricos são conhecidos, principalmente em sistemas policíclicos, nos quais os distanciamentos entre as carbonilas podem ser maiores. Estas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua

atuação biológica. Um exemplo típico é a *orto*-naftoquinona, β -lapachona, do grupo das tabebuias, que é muito mais ativa contra o *Trypanosoma cruzi* que o seu isômero natural, α -lapachona (DA SILVA *et al.*, 2003).

Desta classe, as naftoquinonas são de particular interesse em virtude de sua ampla ocorrência em produtos naturais e como produtos químicos do ambiente. Os primeiros relatos da utilização de extratos vegetais que possuem naftoquinonas datam do Antigo Egito, há cerca de 4.000 anos atrás. O extrato das folhas de *Lawsonia inermis*, rico em lausona, uma das naftoquinonas estruturalmente mais simples obtida naturalmente, era empregado como cosmético para pintura de cabelos, unhas e pele. Posteriormente, o extrato também passou a ser usado no tratamento de micoses e feridas. (FERREIRA *et al.*, 2010).

As naftoquinonas, em geral, são bem conhecidas por apresentar atividades antibacterianas, antifúngicas e antitumoral, e tem sido amplamente testadas em vários estudos farmacológicos. Entre as várias quinonas com atividades farmacológicas, as do grupo lapachol são compostos privilegiados, com diversas atividades. Foram atribuídas ao lapachol e a seus derivados semi-sintéticos, atividades biológicas tais como: atividade cercaricida (prevenção da penetração de cercárias *Schistosoma mansoni* na pele); ação moluscicida (atividade contra caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*); leishmanicida (ação intracelular nas formas amastigotas de *Leishmania (viannia) braziliensis*); tripanossomicida (atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas em sua fase tripomastigota); antimalárico (atividade contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*); uso contra enterovirose; antiinflamatória e antiulcerantes (DA SILVA *et al.*, 2003; GAFNER *et al.*, 1996; KUMAGAI *et al.*, 2011).

Nesse estudo utilizamos três compostos de naftofuranquinonas que foram obtidos a partir do composto C-alil-lausona.

Tabela 1: Compostos de naftofuranquinonas utilizados no estudo

NAFTOFURANQUINONAS	
Composto 1	(2-[iodometil]- 2,3- dihidronafto [2,3- b]furan-4,9-diona)
Composto 2	(2 -[iodometil]- 2,3- dihidronafto [1,2- b]furan-4,5-diona)
Composto 3	(2-metil-2,3-dihidronafto [1,2- <i>b</i>] furan-4,5-diona)

Na Figura 1, está demonstrado de maneira simplificada a via de obtenção dos compostos **1** (2-[iodometil]- 2,3- dihidronafto [2,3- b]furan-4,9- diona), **2** (2 -[iodometil]- 2,3- dihidronafto [1,2- b]furan-4,5-diona) e **3** (2-metil-2,3-dihidronafto [1,2-*b*]furan-4,5-diona).

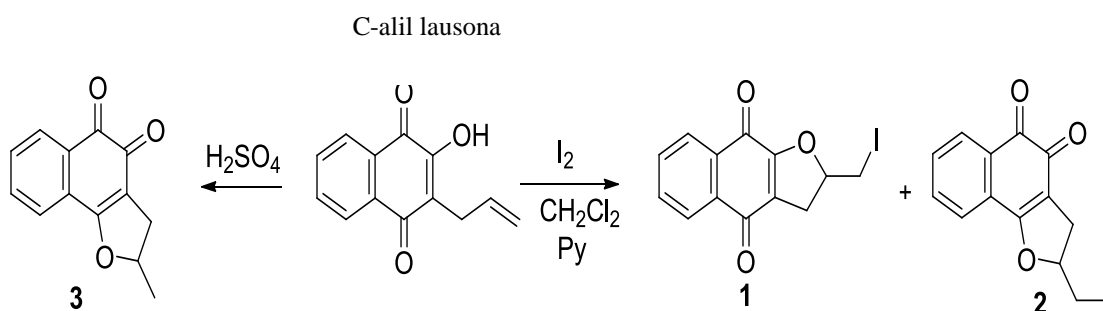


Figura 1: Via de obtenção utilizada para obter os compostos 1, 2 e 3.
Fonte: Silva *et al.* 2006

Os compostos de naftoquinonas **1** e **2** foram sintetizados por meio da reação do composto de C-alil lausona (2-Hidroxi-3-alil-1,4-naftoquinona) com iodo metálico dissolvido numa mistura de diclorometano e piridina, e o composto **3** por dissolução do composto de C-alil lausona em ácido sulfúrico.

4.2 Naftoquinonas - Atividade Farmacológica

O principal interesse nas quinonas advém da sua capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células. Esse estresse pode resultar da ação de muitos agentes ambientais tóxicos sobre seres vivos, como radiações gama e ultravioleta, ozônio e poluentes automotivos no ar, assim como certas substâncias da cadeia alimentar e derivados do tabagismo (GRACY *et al.*, 1999; ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

Os radicais livres são espécies químicas reativas com um elétron não compartilhado que pode ser transferido a outras espécies. A geração de radicais superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são responsáveis pela condição descrita como estresse oxidativo no interior da célula, causando danos irreversíveis em alguns de seus componentes (FERREIRA, *et al.*, 2010; KUMAGAI *et al.*, 2011). O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, leva a um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares que podem provocar a morte celular (FERREIRA *et al.*, 2010).

Uma parte do mecanismo de ação das quinonas envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pela biorredução do núcleo quinonoídico por enzimas específicas e oxigênio, as quais são tóxicas para o *Trypanossoma cruzi* e induzem apoptoses e/ou interagem com topoisomerasas das células tumorais (BENITES, 2008).

O ciclo redox das quinonas onde o substrato quinonoídico (Q) sofre biorredução por um ou dois elétrons, catalisada pelas enzimas NADPH, dentre outras, forma o ânion radical semi-quinona ($Q^{\cdot-}$) *in situ*. Na presença de oxigênio molecular (O_2), esse ânion radical ($Q^{\cdot-}$) transfere um elétron e gera o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) sofre a ação da enzima superóxido desmutase gerando peróxido de hidrogênio, e paralelamente uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} produz o radical hidroxila (Figura 2) (FERREIRA *et al.*, 2010).

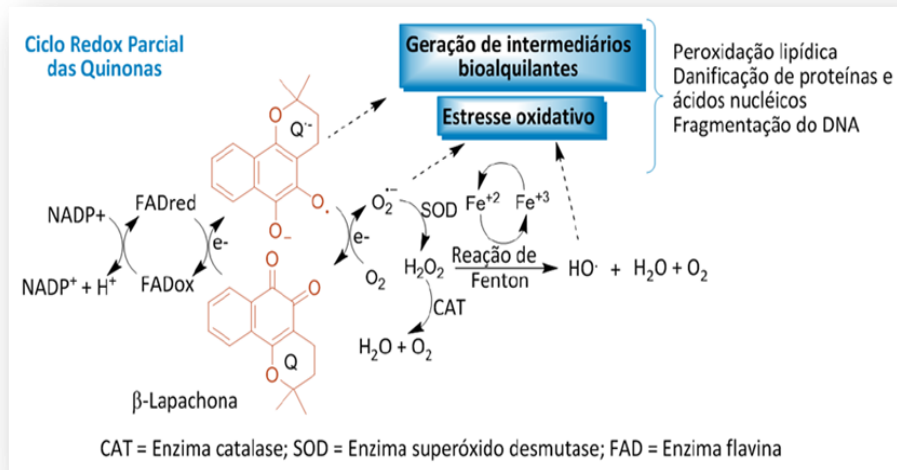


Figura 2 – Resumo esquemático do ciclo redox das quinonas

Fonte: FERREIRA *et al.* (2010)

Embora muito complexo, com etapas ainda desconhecidas, o ciclo redox continua sendo a ferramenta atual de que se valem os farmacologistas para obter conhecimentos sobre a ação citotóxica das naftoquinonas. No estudo do ciclo redox o *T. cruzi* tem sido o modelo experimental mais utilizado até o momento. (DA SILVA *et al.*, 2003).

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, que afeta cerca de 16-18 milhões de pessoas na América Latina. Atualmente, o único agente terapêutico disponível para o tratamento desta doença é o benzonidazol, fármaco da década de 70, que apresenta efeitos colaterais graves e não é eficaz para pacientes crônicos. Uma série de naftoquinonas foram isoladas a partir da flora brasileira e seus derivados semi-sintéticos vem sendo avaliados contra o *T. cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2006).

Buparvaquone é uma naftoquinona com atividade antibiótica estruturalmente relacionada com a atovaquona o qual foi utilizado em clínicas experimentais para o tratamento de *Cryptosporidium parvum*, um protozoário parasita que infecta o trato gastrointestinal humano (MÜLLER E JACOBS, 2002).

4.3 Atividade Citotóxica e Antitumoral

O crescente problema do câncer no mundo desenvolvido, que agora está perdendo apenas para doenças cardiovasculares como causa de morte, tem motivado o crescimento extensivo de pesquisa do câncer nos últimos anos. Iniciativas de investigação em todo o mundo no tratamento de tumores malignos estão focados na descoberta de um novo agente antineoplásico potente e eficaz, particularmente aqueles que interagem com novos alvos biológicos. O Instituto Nacional do Câncer (NCI, Bethesda, MD, EUA) desempenha um importante papel na seleção de uma nova estrutura com atividade antineoplásica e no rastreamento em massa de produtos naturais (RAVELO; BRAUN; PEREZSACAU, 2003; SHUKLA *et al.*, 2012).

Quinonas podem alquilar proteínas essenciais ou inativar enzimas diretamente ou após redução. Ao mesmo tempo, a toxicidade direta pode surgir como um resultado da sua utilização, bem como a toxicidade indireta, através do metabolismo de outras drogas e várias toxinas ambientais ou constituintes dietéticos. A biotransformação hepática de derivados das naftoquinonas pode levar à lesão celular através de vários mecanismos e esta área ainda não recebeu investigação suficiente.

Muitos derivados de orto-naftoquinona são citotóxicos e têm sido utilizados como drogas antitumorais. Tiossemicarbazonas e semicarbazonas também têm recebido atenção considerável devido à atividade anticancerígena a que estão associados, e numerosas hidrazonas e derivados oxima também são estudados por serem citotóxicos. SHUKLA *et al.*(2012) concluíram que uma combinação de grupos carbazona e amino ao núcleo da orto-naftoquinona na segunda e quarta posição, respectivamente, mostra um aumento da atividade antineoplásica e, portanto, eles são ideais para obter novos compostos antitumorais mais eficazes.

4.5 Atividade Antibacteriana e Antifúngica

A incidência de infecções fúngicas e bacterianas ainda permanece um importante problema de difícil tratamento devido a uma combinação de fatores, incluindo doenças infecciosas emergentes e também por causa do crescente número de patógenos microbianos multi- resistentes às drogas (IBIS *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação das naftoquinonas foi estudada por Haraguchi *et al.* a partir do fungo *Fusarium*. Eles explicam que as naftoquinonas atuavam estimulando a

geração do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, e este fato poderia explicar a atividade destes compostos. (RAVELO; BRAUN; PEREZ-SACAU, 2003).

Guiraud *et al.* comparou as atividades bactericida e fungicida do lapachol e β -lapachona, concluiu que os fungos foram consideravelmente mais sensíveis do que as bactérias, particularmente para β -lapachona. (RAVELO; BRAUN; PEREZ-SACAU, 2003).

As atividades antifúngicas *in vitro* de derivados das naftoquinonas, que são constituintes de raízes de *Lithospermum erythrorhizon*, foram investigados contra vários fungos patogênicos. SASAKI *et al.* relataram a primeira evidência sobre a atividade antifúngica destas naftoquinonas. Quando as atividades biológicas destes compostos foram testados contra os fungos, foi mostrada uma vasta gama de sensibilidade. Esse estudo demonstrou que a naftoquinona Shikonina mostrou ter uma ação mais forte do que o fluconazol contra fungos leveduriformes: quatro vezes contra *Candida krusei* (concentração inibitória mínima (MIC): 4 μ g/ml) e duas vezes (MIC: 4 μ g/ml) contra *Saccharomyces cerevisiae*, embora mostrou a mesma potência que o fluconazol contra *C. glabrata*. A naftoquinona Deoxishiconina também apresentou quatro vezes mais forte atividade contra *C. krusei* (MIC: 4 μ g/ml) e três vezes (MIC: 2 μ g/ml) mais forte contra *S. cerevisiae*. As naftoquinonas Acetilshiconina e β -hidroxiisovalerilshiconina apresentaram atividades mais baixas contra todos os fungos exceto para *C. krusei* em comparação com o padrão. Contra o fungo filamentoso *Trichosporon cutaneum*, todas as naftoquinonas mostraram ter uma gama de atividades com menor potência do que o padrão. Este resultado proporciona uma base racional para o uso clínico de Shikonina e mostra a possibilidade da sua utilização no tratamento medicinal como um agente anti-inflamatório e com atividade antifúngica (SASAKI; ABE; YOSHIZAK, 2002).

IBIS *et al.* sintetizou diferentes naftoquinonas heterocíclicas e avaliou sua atividade antifúngica contra os fungos *Candida tenuis* MDV Y-70 e *Aspergillus niger* F-1119 pelo método de difusão e o método de diluição em série, com a finalidade de desenvolver agentes terapêuticos possuindo amplo espectro de atividade antifúngica. A atividade antibacteriana desses compostos sintetizados foi elucidada contra *Escherichia coli* B-906, *Staphylococcus aureus* 209-P, e *Mycobacterium luteum* b-917. Seus estudos levaram à identificação de potentes agentes antibacterianos e agentes antifúngicos a partir dos derivados de quinonas heterocíclicas (IBIS *et al.*, 2011).

Quinonas heterocíclicas constituem um importante grupo de substratos. A estrutura destes substratos é frequentemente encontrada em compostos de ocorrência

natural e é incorporado biologicamente aos compostos ativos sintéticos. Estudos de relação estrutura e atividade a partir de compostos quinonóide mostrou que a posição e número de átomos de nitrogênio foram fatores consideravelmente importantes por afetarem as atividades biológicas. Geralmente, o aumento do número de átomos de nitrogênio substituintes melhora essas atividades. Foi descrito que bis(ariltio)-quinolina-5,8-dionas e de 6-arilaminoquinolina 5,8-dionas exibiu atividade antifúngica contra fungos patogênicos. A presença de grupos amino, tio, ou cloro nas quinonas foi fator consideravelmente importante para o efeito da atividade antifúngica (IBIS *et al.*, 2011).

Uma série de estudos têm também demonstrado que os derivados de naftoquinonas substituídas mostraram uma atividade particularmente marcada contra fungos. Recentemente, *Freire et al.* relataram a síntese de naftoquinonas dihidrofurano como novo composto que apresenta um grande potencial na aplicação farmacológica. Nesse trabalho foi focado a síntese de α - e β -2, 3-naftoquinonas dihidrofurano e sua avaliação contra seis cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. Tropicalis* e *C. Dubliniensis*), isoladas a partir da cavidade bucal de pacientes com dentaduras removíveis. Os resultados revelaram que os substituintes α -furano-naftoquinonas apresentam maior atividade antifúngica do que os compostos β - furano-naftoquinonas. (FREIRE *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o presente estudo justifica-se pela carência de pesquisas a respeito da possível atividade antifúngica de compostos de naftofuranquinonas frente a cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol. Apesar dos diversos avanços terapêuticos, o tratamento da candidemia ainda é limitado, devido ao número limitado de agentes antifúngicos. Deste modo, esta pesquisa colaborou para ampliar os conhecimentos a respeito da atividade de fármacos oriundos de fontes naturais sobre a inibição do crescimento de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol. Não se contentando apenas com a provável atividade antifúngica das naftofuranquinonas, estudamos também os prováveis mecanismos de ação desses compostos.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Compostos de naftoquinonas apresentam atividade antifúngica frente a cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol?
2. Qual o provável mecanismo de ação deste composto?

3 HIPÓTESES

1. Compostos de naftoquinonas apresentam atividade antifúngica, *in vitro*, contra cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol.
2. O provável mecanismo de ação das naftoquinonas seria através da capacidade desses compostos em induzir o estresse oxidativo nas células.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar o efeito antifúngico de três compostos de naftoquinonas frente a cepas de *Candida tropicalis* resistentes e sensíveis ao fluconazol.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de três compostos de Naftoquinonas frente a cepas de *C.tropicalis*;
2. Avaliar o possível mecanismo de ação através da citometria de fluxo e teste do cometa.

5 CAPÍTULO - ARTIGO

Atividade antifúngica *in vitro* de compostos naftoquinoidais contra cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol

Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of *C. tropicalis*

Periódico: Medical Mycology
(Submetido em Janeiro de 2013)

Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of *C. tropicalis*

Short title: Antifungal activity of naphthoquinoidal against *C. tropicalis*

João B. A. Neto¹, Cecília R. da Silva^{1,2}, Maria A. S. Neta^{1,2}, Janaína T. Siebra¹, Rose A. C. Silva¹, Hemerson I. F. Magalhães^{1,3}, Manoel O. de Moraes⁴, Marina D. P. Lobo⁵, Thalles B. Grangeiro⁵, Tatiane S. Carvalho⁶, Emilay B. T. Diogo⁷, Eufrânio N. da Silva Júnior⁷, Bruno C. Cavalcanti^{2,4} and Hélio V. N. Júnior^{1,2,4*}

1. Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

2. Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

3. Central Public Health Laboratory (LACEN-CE), Fortaleza, CE, Brazil

4. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

5. Department of Biology, Science Center, Molecular Genetics Laboratory, Federal University of Ceará, CE, Brazil;

6. Natural Products Research Nucleus, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

7. Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Laboratory of Synthetic and Heterocyclic Chemistry, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil.

*Corresponding author:

Telephone number: # 55 85 3366 8274

Fax: # 55 85 3366 8257

E-mail: label_ufc@yahoo.com.br

Abstract

In recent decades, the incidence of candidemia in tertiary hospitals worldwide has substantially increased. These infections are a major cause of morbidity and mortality; in addition, they prolong hospital stays and raise the costs associated with treatment. Studies have reported a significant increase in infections by non-*albicans* *Candida* species, especially *C. tropicalis*. The number of antifungal drugs on the market is small in comparison to the number of antibacterial agents available. The limited number of treatment options, coupled with the increasing frequency of cross-resistance, makes it necessary to develop new therapeutic strategies. The objective of this study was to evaluate and compare the antifungal activities of three semisynthetic naphthofuranquinone molecules against fluconazole-resistant *C. tropicalis* strains. These results allowed to us to evaluate the antifungal effects of three naphthofuranquinones on fluconazole-resistant *C. tropicalis*. The toxicity of these compounds was manifested as increased intracellular ROS, which resulted in membrane damage and changes in cell size/granularity, mitochondrial membrane depolarization, and DNA damage (including oxidation and strand breakage). In conclusion, the tested naphthofuranquinones (compounds **1-3**) exhibited in vitro cytotoxicity against fluconazole-resistant *C. tropicalis* strains.

Keywords: *C.tropicalis*, resistance, naphthoquinones, antifungal activity, flow cytometry.

1. Introduction

The incidence of candidemia in tertiary hospitals worldwide has substantially increased in recent decades. Candidemia is a major cause of morbidity and mortality, especially in immune-compromised patients and those who are hospitalized with severe underlying diseases. Moreover, these infections prolong hospital stays and increase the costs associated with treatment. Thus, *Candida* species represent a group of medically important pathogenic fungi [1-3]. Previous studies have reported a significant increase in the number of infections by non-*albicans* species (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*), corresponding to 36-63% of all cases [4,5]. As an invasive fungus, *Candida tropicalis* is a major non-*albicans Candida* species that causes fungemia in patients [6-8]. *C. tropicalis* is the second-most commonly isolated *Candida* species in Brazilian hospitals [9]. The widespread occurrence of *C. tropicalis* in Brazilian hospitals may be explained by the high level of resistance to certain antifungal drugs among non-*albicans* species, as demonstrated by the numerous reports of fluconazole-resistant clinical isolates of *C. tropicalis* in recent years [10].

Antimicrobial resistance has become increasingly important in antifungal therapy because resistance to almost all antifungal agents, especially fluconazole, has been found in clinical isolates of *Candida* spp. This resistance constitutes a major public health problem because there are a limited number of antifungal agents available on the market [14]. Thus, the search for new therapeutic strategies has become a pressing concern [16].

Quinones are a large and varied family of organic metabolites from natural sources with chemical properties that allow them to interact with biological targets. Interest in

these substances has intensified in recent years due to their critical importance in several biochemical processes, and quinones have become increasingly prominent in pharmacological studies [18]. Naphthoquinones are an important quinone subclass of biologically active molecules that possess antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antipyretic, anticancer and trypanocidal activities [3].

Natural products are important source of candidates for anti-infective and antitumor agents. However, natural products have problems related to their physicochemical characteristics implying deficient pharmacokinetic parameters. Moreover, obtaining large amounts of a product of natural origin precludes its use as a drug. As a result, the semi-synthesis has emerged as a tool for further structural modification in order to modulate the biological properties of these purely natural products (the naphthoquinones for instance) [27]. The clinical importance of these molecules stimulated the search and synthesis of new agents, because naphthoquinones derivatives substituted may have a more pronounced antifungal activity [28].

The aim of the current study was to evaluate the antifungal activity of methylated and iodinated naphthofuranquinones obtained from C-allyl lawsone [29] against isolates of fluconazole-resistant *C. tropicalis*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The three naphthofuranquinones used in this study were compound **1** (2-[iodomethyl]-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione), compound **2** (2-[iodomethyl]-2,3-dihydronaphtho[1,2-*b*]furan-4,5-dione) and compound **3** (2-methyl-2,3-dihydronaphtho[1,2-*b*]furan-4,5-dione), which were synthesized as described by Silva et al. [29]. Compounds **1** and **2** were produced by reacting C-allyl lawsone with metallic iodine in dichloromethane, as shown in Figure 1. Compound **3** was also synthesized

from C-allyl lawsone, but a simple cyclization using sulphuric acid was performed (Figure 1). All of the compounds were prepared in yields comparable to those described in the literature [29].

2.2. Isolates

In this study, we used seven strains of FLC-resistant *C. tropicalis* that had been isolated from blood from fungemia patients and were part of the Collection of Yeasts of the Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL) affiliated with the School of Pharmacy at the Federal University of Ceará (FF/UFC). The strains were incubated on Sabouraud dextrose agar (Himedia, Mumbai, India) at 37°C for 24 h, were plated on CHROMagar Candida® medium (Himedia) to assess their purity and underwent molecular identification.

2.3. Molecular identification

Genomic DNA was purified using a CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide)-based protocol, as previously described [30]. A nuclear DNA region comprising the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) and ITS5 (5-GCAAGTAAAAGTCGTAACAAGA-3), as suggested by White et al.[31]. After the specificity of the amplifications was confirmed, the PCR products were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, United State) [32]. The concentrations of the purified PCR products were determined by measuring the absorbances at 260 nm of ten-fold dilutions. DNA sequencing was performed using the DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare Life Sciences) according to the manufacturer's protocol, and both strands were sequenced using the ITS4 and ITS5 primers. The sequencing reactions

were then analysed in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE Healthcare Life Sciences). The sequencing parameters included sample injection at 3 kV for 50 s and electrophoresis at 6 kV for 180 min. Automated base calling was performed with Cimarron 3.12 software, and the electropherograms were visualized with Sequence Analyzer v4.0 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). The base sequences were then deduced by an inspection of each processed data trace, and the complete sequences were assembled using Cap3 software [33]. The resulting sequences were compared to those previously deposited in the GenBank database using the BLAST program [34].

2.4. In vitro antifungal activities

The broth microdilution (BMD) antifungal susceptibility test was performed according to the document M27-A3 using RPMI broth (pH 7.0) buffered with 0.165 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA). Fluconazole (Sigma Chemical) and naphthofuranquinone (compounds **1-3**) were dissolved in distilled water and dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Chemical), respectively. The fluconazole was tested at a range of concentrations from 0.125-64 mg/L, and the naphthofuranquinones (compounds **1-3**) were tested at 0.25-128 mg/L. The 96-well culture plates were incubated at 35°C for 48 h, and the results were examined visually, as recommended by the CLSI [35]. The MIC was considered to be the concentration that inhibited 50% of fungal growth. The in vitro drug interactions were evaluated according to the MIC, and the strains were classified as susceptible (S), or resistant (R). The cutoff points for fluconazole susceptibility were as follows: MIC \leq 2 mg/L (S), MIC \geq 8 mg/L (R) [36]. The strains *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as controls[35].

2.5. Cell treatments

To determine their cell density, membrane integrity and mitochondrial transmembrane potential, fluconazole-resistant strains were exposed to various concentrations (0.25-128 mg/L) of naphthofuranquinones (compounds **1-3**). Fluconazole-susceptible strains were treated with fluconazole (64 mg/L) at 37 ° C for 24 h [38]. To evaluate the oxidative stress and DNA damage caused by the treatments, the resistant and susceptible strains of *C. tropicalis* were exposed to varying concentrations (0.25-128 mg/L) of compounds **1-3** for 24 h. Treatment with amphotericin B (Ampho) (Sigma Chemical) was used as a positive control for cell death; the toxic effects of this substance include the condensation and fragmentation of nuclear chromatin, as well as the accumulation of reactive oxygen species (ROS) [39]. All of the experiments were performed in triplicate in three independent experiments.

2.6. Preparation of yeast suspensions

Cell suspensions were prepared from cultures in the exponential growth phase. The cells were harvested, centrifuged (1600g for 10 min at 4 °C), washed twice with an 0.85% saline solution (1200g for 5 min at 4 °C) and then resuspended ($\sim 10^6$ cells/mL) in HEPES buffer (N- [2-hydroxyethyl] piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (Sigma-Aldrich®) supplemented with 2% glucose, pH 7.2.[38].

2.7. Determination of cell density and membrane integrity

The cell density and membrane integrity of the fungal strains were evaluated by the exclusion of 2 mg/L propidium iodide (PI). Aliquots removed after a 24 h incubation with drugs (compounds **1-3**; fluconazole; Ampho) were analysed using flow cytometry. A total of 10 000 events were evaluated per experiment (n=2), with the cellular debris omitted from the analysis. The cellular fluorescence was then determined using flow cytometry in a Guava EasyCyte™ Mini System cytometer (Guava

Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) and analysed with CytoSoft 4.1 software [41].

2.8. Detection of reactive oxygen species (ROS) in yeast

For the detection of ROS produced over a 24 h culture period, cells were incubated with 20 μ M CM-H₂DCFDA (5-[and-6]-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester) for 30 min in the dark at 35°C. Next, the cells were harvested, washed, resuspended in PBS and immediately analysed using flow cytometry (Guava EasyCyte Mini). CM-H₂DCFDA readily diffuses through the cell membrane and is hydrolysed by intracellular esterases to non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH), which is then rapidly oxidized to highly fluorescent DCF (2',7'-dichlorofluorescein) as a result of a broad range of intracellular oxidative stresses other than H₂O₂ [42]. The fluorescence intensity of the DCF is proportional to the amount of ROS formed inside the cell [43].

2.9. Measurement of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi$ m)

The mitochondrial transmembrane potential was determined by the retention of rhodamine 123 dye by fungal strains after exposure 24 h. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), incubated with rhodamine 123 (5 mg/L) at 37°C for 30 min in the dark, and then washed twice with PBS. Their fluorescence was measured using flow cytometry (Guava EasyCyte™ Mini System). A total of 10 000 events were evaluated per experiment (n=2), and the cellular debris was omitted from the analysis [40,].

2.10. Yeast comet assay

The alkaline comet assay was performed essentially as described by [45]. Up to 200 μ L of 0.5% agarose (normal-melting point) was spread onto each slide, and this supportive agarose layer was air-dried prior to the application of the cell suspension.

Yeast cells were centrifuged in an Eppendorf microcentrifuge for 5 min, washed with distilled water, and resuspended in S-buffer (1 M sorbitol and 25 mM KH_2PO_4 , pH 6.5). Aliquots of approximately 5×10^4 cells were mixed with 0.7% low-melting point agarose containing 2 mg/mL zymolyase 20T (Seikagaku Corp., Japan) and were spread over the agarose layer. The slides were then covered with coverslips and were incubated for 20 min at 30°C to disintegrate the yeast cell walls and to obtain spheroplasts. To minimize the activity of endogenous cellular enzymes, all further procedures were performed at 8-10° C. The coverslips were removed, and the slides were incubated in 30 mM NaOH, 1 M NaCl, 0.1% laurylsarcosine and 50 mM EDTA, pH 12.3 for 1 h to lyse the spheroplasts. The slides were washed three times for 20 min each in 30 mM NaOH and 10 mM EDTA, pH 12.4 to unwind the DNA. The slides were then subjected to electrophoresis in the same buffer for 20 min at 0.5 V/cm and 24 mA. After the electrophoresis, the slides were neutralized by submerging the slides in 10 mM Tris-HCl at pH 7.5 for 10 min, followed by consecutive 10-min incubations in 76% and 96% ethanol. Finally, the slides were allowed to air-dry and were then stained with ethidium bromide (1 mg/mL) and visualized by fluorescence microscopy []. All of the above steps were conducted in the dark to prevent additional DNA damage.

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of 2 replicate slides) from each experimental group were analysed. The cells were visually scored and were assigned to one of five classes according to tail size (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4), and a damage index value was calculated for each sample of cells. The damage index values ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (displaying maximum damage: 100 cells x 4) [. The ratio of tailed cells (indicating DNA strand breakage) to normal cells was calculated.

2.11. Analysis of oxidized DNA purine bases in yeast cells

The levels of oxidized purine bases were estimated with the alkaline comet assay, as described above. Briefly, the slides were removed from the lysis solution and were washed three times in an enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, and 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), drained, and incubated with 70 µL FPG for 30 min at 37°C. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of 2 replicate slides) from each group were visually analysed. The number of oxidized purines (FPG-sensitive sites) was then determined by subtracting the number of strand breaks present in samples incubated with buffer alone from the total number of breaks observed after the incubation with FPG, according to the methods of da Silva Júnior et al.[20].

3. Statistical analysis

The in vitro susceptibility experiments were repeated at least three times on different days. Geometric means were used to compare the MIC results. The data obtained from the flow cytometry and alkaline comet assays were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test ($P < 0.05$).

4. Results

4.1. Molecular identification

The complete ITS/5.8S region (ITS1, 5.8S, and ITS2) of the nuclear ribosomal DNA was amplified, sequenced and compared to the sequences deposited in the GenBank database (data not shown). The BLAST searches revealed that the sequences from the seven isolates were identical to the ITS/5.8S sequences from different isolates and strains of *C. tropicalis*, and all the matching sequences were from this same species.

4.2. Antifungal effects of naphthofuranquinones against fluconazole-resistant *C. tropicalis*

The susceptibility of each strain to fluconazole was evaluated using microdilution. After 48 h of exposure to fluconazole, all the tested *C. tropicalis* strains exhibited MICs higher than 64 mg/L. The growth inhibition induced by the different compounds was also determined. Compounds **1-3** displayed potent antifungal activities (Table 1).

4.3. The changes in cell size/granularity, loss of cell viability and plasma membrane damage in *C. tropicalis* after naphthofuranquinone treatment

In all of the fluconazole-resistant *C. tropicalis* strains evaluated, the above changes in cell size/granularity were observed only after 24 h of exposure to naphthofuranquinone compounds **1-3** (Figure 3A). As shown in Figure 2, the fluconazole-resistant strains that were treated with azole showed no reduction in the number of viable cells compared with the control ($P < 0.05$), but the cells treated with naphthofuranquinones (compounds **1-3**) for 24 hours exhibited significant decreases in cell viability ($P < 0.05$). As shown in Figure 3A, the fluconazole-resistant strains did not display increased plasma membrane instability after exposure to fluconazole. However, treating the fluconazole-resistant strains with the naphthofuranquinone compounds for 24 h induced a significant increase ($P < 0.05$) in the number of cells with plasma membrane lesions (Figure 3B).

4.4. Naphthofuranquinones increased the intracellular levels of ROS in *C. tropicalis*

C. tropicalis cells from strains that were both sensitive and resistant to fluconazole showed significant increases ($P < 0.05$) in ROS production after exposure to compounds **1-3** compared with the negative control group (Figure 4).

4.5. Measurement of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$)

After 24 h of exposure, significant changes in the $\Delta\psi_m$ were observed in fluconazole-resistant strains treated with naphthofuranquinones (Figure 5) compared with the negative control group ($P < 0.05$). Amphotericin B was used as positive control.

4.6. DNA Damage

As shown in Figure 6, the three tested naphthofuranquinone compounds induced increased DNA damage in the fluconazole-resistant strains compared with the negative control group ($P < 0.05$). Moreover, the fluconazole-resistant strains that had been incubated with FPG showed significantly increased DI values after naphthofuranquinone treatment compared with the control group ($P < 0.05$). Amphotericin B was used as a positive control.

5. Discussion

The results of this study suggest that compounds **1-3** have potential antifungal effects. The antifungal activities of quinone derivatives have been noted in several recent studies [47,] showing that naphthoquinones possess antifungal activity against various pathogenic yeasts. When *C. tropicalis* was exposed to the naphthofuranquinone compounds, the number of viable cells decreased, indicating impairment of the cell membranes.

The *C. tropicalis* cells suffered significant changes in cell size/granularity when exposed to naphthofuranquinones**1-3**. The flow cytometric analysis revealed that the fluconazole-resistant cells showed a decreased size (FSC) and an increased granularity (SSC) indicative of cell death [51]. In the presence of PI, a portion of the cells become PI-positive when exposed to compounds**1-3**. The increased PI uptake in the fluconazole-resistant *C. tropicalis* cells indicates that these compounds induce cell death, considering that PI can bind to DNA only by reaching the cores of dead cells

[52]. The antifungal effect was the most pronounced in the strains treated with compound **3**, suggesting a possible structure-activity relationship.

The *C. tropicalis* strains showed an increase in total ROS levels after treatment with methylated and iodinated naphthoquinones **1-3**. These data corroborate those reported by Xu et al. [52] who demonstrated that ROS levels increased in *Saccharomyces cerevisiae* strains after treatment with a quinone-derived compound. ROS are essential regulators of aging and are reported to be key players in cell death [51] they also have play important role in the cytotoxicity of quinoidal compounds in various organisms, including yeast [52]. The abovementioned increased levels of intracellular ROS can be explained by the action of quinones via the inhibition of cellular respiration enzymes [54].

The mitochondrial function was affected in the cells treated with compounds **1-3**. The results suggest that these naphthofuranquinones may interfere with mitochondrial respiratory function, causing the $\Delta\psi_m$ to collapse and the Rh123 to not accumulate in the mitochondria. This evidence corroborates the findings of Emadi et al.[55] by showing that molecules derived from naphthoquinones can promote the depolarization of yeast mitochondrial membranes. A $\Delta\psi_m$ collapse can lead to transient pore openings in the mitochondrial membranes and the release of pro-apoptotic factors into the cytosol [57]. Cell death in yeast correlates with $\Delta\psi_m$ dysfunction stemming from oxidative damage caused by ROS accumulation [52] therefore, the formation of free radicals appears to be an important mechanism of cytotoxicity caused by treatment with compounds **1-3** in fluconazole-resistant *C. tropicalis* strains.

Cell membranes are often permeable to naphthoquinones, as evidenced by the action of these molecules at the DNA level to induce single- or double-strand breaks at basic sites [20]. Naphthoquinones are highly lipophilic, and exogenous chemical

compounds, such as naphthoquinones, are prevented from reaching the intracellular active sites by hydrophobic interactions [3]. The treatment of *C. tropicalis* strains with compounds **1-3** promoted DNA damage, and it is known that structural modifications of nucleotide bases can be a consequence of oxidative stress [20]. The naphthoquinoidal compounds **1-3** showed the ability to induce DNA breaks through the generation of intracellular ROS. This result highlights the importance of ROS for the cytotoxic effects of naphthofuranquinones on fluconazole-resistant *C. tropicalis* strains because the oxidation of nucleotide bases is as important as DNA breakage for the overall function and survival of the cell [20].

In summary, the present data maybe results of prototypes suggest that these compounds may be used as antifungal agents for the treatment of candidemia.

Acknowledgements

The authors wish to thank Professor Antonio V. Pinto (in memoriam) and Maria do Carmo F.R. Pinto for stimulating discussions and consistently excellent advice. Dr. E.N. da Silva Júnior thanks FAPEMIG (APQ-04166-10) and the Universidade Federal de Minas Gerais.

Funding: This work was supported by grants and fellowships from CNPq and CAPES/Brazil and FUNCAP/Ceará.

Competing interests: None declared.

References

- [1] Yamamoto ACA, Paula CR, Dias LB, Tadano T, Martins ER, Amadio JVRS, et al. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá – Mato Grosso, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2012; 29: 164–8.
- [2] Sellami A, Sellami H, Néji S, Makni F, Abbas S, Cheikhrouhou F, et al. Antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Sfax hospital: Tunisia. *Mycopathologia* 2011; 171: 417-22.
- [3] Guo J, Song W, Ding F, Zhang J, Sun Z. Study on cytotoxicity and structure–activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 33: 408-13.
- [4] Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 288-305.
- [5] Chi HW, Yang YS, Shang ST, Chen KH, Yeh KM, Chang FY, Lin JC. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44: 369-75.
- [6] Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 58: 77–82.
- [7] Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* 2010; 59: 873-80.
- [8] Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73: 45-8.

- [9] Storti LR, Pasquale G, Scomparim R, Galastri AL, Alterthum F, Gambale W, et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the pediatric unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 225-31.
- [10] Hinrichsen SL, Falcão E, Santos Vilella TA, Rêgo L, Lira C, Almeida L, et al.. *Candida* Isolates In Tertiary Hospitals In Northeastern Brazil. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 325-8.
- [11] Yang YL, Ho YA, Cheng HH, Ho M, Lo HJ. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 60-4.
- [12] Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA, FIMUA–ECMM candidaemia study group. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 679–82.
- [13] Myoken Y, Kyo T, Fujihara M, Sugata T, Mikami Y. Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azoles-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* 2004; 89: 378–80.
- [14] Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125: S3-13.
- [15] Huang M, Kao KC. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters* 2012; 333: 85-93.
- [16] Wakieć R, Prasad R, Morschhäuser J, Barchiesi F, Borowski E, Milewski S. Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 2007; 50: 109-15.
- [17] Tobudic S, Kratzer C, Presterl E. Azole-resistant *Candida* spp – emerging pathogens? *Mycoses* 2012; 55: 24–32.

- [18] Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012; 52: 221-47.
- [19] da Silva MN, Ferreira VF, de Souza MC. A current overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -lapachone and derivatives. *Quim Nova* 2003; 26: 407-16.
- [20] da Silva EN Jr, Cavalcanti BC, Guimarães TT, Pinto Mdo C, Cabral IO, Pessoa C, et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 399-410.
- [21] da Silva EN Jr, de Deus CF, Cavalcanti BC, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, et al. 3-Arylamino and 3-Alkoxy-nor- β -lapachone Derivatives: Synthesis and Cytotoxicity against Cancer Cell Lines. *J Med Chem* 2010; 53: 504–8.
- [22] da Silva EN Jr, Guimarães TT, Menna-Barreto RF, Pinto Mdo C, de Simone CA, Pessoa C, et al. The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: Synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 3224–30.
- [23] da Silva Júnior EN, de Souza MC, Fernandes MC, Menna-Barreto RF, Pinto Mdo C, de Assis Lopes F, et al. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 5030-8.
- [24] Elingold I, Taboas MI, Casanova MB, Galleano M, Silva RS, Menna-Barreto RF, et al. Mechanism of action of novel naphthofuranquinones on rat liver microsomal peroxidation. *Chem Biol Interact* 2009; 182: 213-9
- [25] da Silva AJ, Netto CD, Pacienza-Lima W Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B, Maurel S, et al. Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1, 4-naphthoquinone derivatives. *J Braz Chem Soc* 2009; 20: 176–82.

- [26] Bonifazi EL, Ríos-Luci C, León LG, Burton G, Padrón JM, Misico RI. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 2621-30.
- [27] Oliveira MH, Innocente AM, Pereira AG, Dias DO, Oliveira EG, Barreto F, et al. Semi-Synthesis: A solution to problems of pharmacological natural products. *Electronic Journal of Pharmacy* 2012;9:62-88.
- [28] Freire CP, Ferreira SB, Oliveira NS, Matsuura ABJ, Gama IL, da Silva FC, et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofurannaphthoquinones as potent anticandidal agentes. *Med Chem Commun* 2010; 1: 229–32.
- [29] Silva RS, Costa EM, Trindade UL, Teixeira DV, Pinto Mde C, Santos GL, et al. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 526-30.
- [30] Warner S. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. Sussex: John Wiley Sons, 1996; 51-73.
- [31] White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press, 1990; 315–22.
- [32] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [33] Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 1999; 9: 868-77.
- [34] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.

- [35] Institute CaLS. References Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3, 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [36] Pfaller MA, and DJ Diekema. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. *J. Clin. Microbiol* 2012 50:2846-2856.
- [37] Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mårdh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 678-85.
- [38] Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi. *Methods in Molecular Biology* 2010; 638: DOI: 10.1007/978-1-60761-5_21.
- [39] Almeida B, Silva A, Mesquita A, Sampaio-Marques B, Rodrigues F, Ludovico P. Drug-induced apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 1436-48.
- [40] Pinkerton DM, Banwell MG, Garson MJ, Kumar N, de Moraes MO, Cavalcanti BC et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E-J, BE-18591, and a related alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *Chemistry & Biodiversity* 2010; 7: 1311-24.
- [41] Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *Journal of infection* 2007; 54: 504-8.
- [42] Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 146-59.

- [43] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 227-31.
- [44] Ludovico P, Sansonetty F, Corte-Real M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology* 2001; 147: 3335-43.
- [45] Miloshev G, Mihaylov I, Anachkova B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutat Res* 2002; 513: 69-74.
- [46] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-61.
- [47] Santos MM, Faria N, Iley J, Coles SJ, Hursthouse MB, Martins ML. Reaction of naphthoquinones with substituted nitromethanes. Facile synthesis and antifungal activity of naphtho[2,3-d]isoxazole-4,9-diones. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett* 2010; 20: 193-5.
- [48] Tandon VK, Maurya HK, Mishra NN, Shukla PK. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 3130-7.
- [49] Shukla S, Srivastava RS, Shrivastava SK, Sodhi A, Kumar P. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of 1,2-naphthoquinone and its derivatives. *Applied biochemistry and biotechnology* 2012; 167: 1430-45.
- [50] Kawiak A, Zawacka-Pankau J, Wasilewska A, Stasiłojc G, Bigda J, Lojkowska E. Induction of Apoptosis in HL-60 Cells through the ROS-Mediated Mitochondrial Pathway by Ramentaceone from *Drosera aliciae*. *J Nat Prod* 2012; 75: 9-14.
- [51] Cho J, Lee DG. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochimie* 2011; 93: 1873-9.

- [52] Xu C, Wang J, Gao Y, Lin H, Du L, Yang S et al. The anthracenedione compound bostrycin induces mitochondria mediated apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 2010; 10: 297-308 .
- [53] Hwang B, Hwang JS, Lee J, Kim JK, Kim SR, Kim Y. Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2011; 408: 89-93
- [54] Murakami K, Haneda M, Iwata S, Yoshino M. Effect of hydroxy substituent on the prooxidant action of naphthoquinone compounds. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 905-9.
- [55] Emadi A, Ross AE, Cowan KM, Fortenberry YM, Vuica-Ross M. A chemical genetic screen for modulators of asymmetrical 2,2'-dimeric naphthoquinones cytotoxicity in yeast. *PLoS One* 2010; 5: e10846.
- [56] Hwang IS, Lee J, Jin HG, Woo ER, Lee DG. Amentoflavone stimulates mitochondrial dysfunction and induces apoptotic cell death in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 2012; 173: 207-18.
- [57] Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006; 85: 149–54.

6 CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados, os compostos de naftoquinonas (Compostos 1, 2 e 3) demonstraram uma potente atividade *in vitro* contra as cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol. Os compostos de naftoquinonas, além de alterarem a integridade da membrana plasmática e mitocondrial, parecem interagir indiretamente com o DNA, possivelmente pelo acúmulo intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio. (ROS).

7 PERSPECTIVAS

Pelos resultados obtidos e analisados pode-se observar que esses compostos tornam-se potentes candidatos à serem utilizados como compostos antifúngicos, onde a busca por novos agentes antifúngicos torna-se cada vez mais necessária nos dias atuais, devido ao limitado número de drogas antifúngicas disponíveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal Clinical Microbiology*, v. 43, n.4, p.1829-1835, 2005.

BARELLE, C. J., DUNCAN, V. M. S.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R.; ODDS F. C. Azole antifungals induce up-regulation of SAP4, SAP5 and SAP6 secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, v.61, p. 315-322, 2008.

BENITES, J. ; VALDERRAMA, J. A.; RIVERA. F.; ROJO, L.; CAMPOS, N.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M. S. J. Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. *Bioorg. Med. Chem*, 16: 862-868, 2008.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* v.100, p.131–134, 2005.

CHAGAS-NETO, T.C.; CHAVES, G.M.; MELO, A.S.A.; COLOMBO, A.L. Bloodstream Infections Due to *Trichosporon* spp.: Species Distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47(4): 1074–1081, 2009.

CHI, H.W.; YANG, Y.S.; SHANG, S.T., KE-HUNG CHEN, K.H.; YEH, K.M.; CHANG, F.Y. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v.44, n.5, p.369-75, 2011.

CHOU, H.H.; LO, H.J.; CHEN, K.W.; LIA,M.H.; LI,S.Y. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.58, p. 427–433, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.. References Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3, 3rd ed Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M. J.; SILVA, M. T.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, v. 71, p. 19-33, 2002.

CUENCA-ESTRELA, M.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MELLADO, E.; WARNOCK, D.W. Comparative Evaluation on NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.46, p. 3644-7, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista Espanhola de Quimioterapia*, v. 23, p. 169-17, 2010.

DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados. *Química Nova*. 26 (3): 407-416, 2003.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* Hyphal Formation and the Expression of the Efg1-Regulated Proteinases Sap4 to Sap6 Are Required for the Invasion of Parenchymal Organs. *Infection and Immunity*, v.70, p. 3689-3700, 2002.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Rev. Virtual Química*, 2 (2):140-160, 2010.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J.F.; QUESADA, R.M.B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M.T.; SERPA, R.; FRANÇA, E.J.G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n.5, p. 595-599, 2011.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J.L.; NIANGA, M.; EVANS, H.S.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry*. v.42, p.1315-1320, 1996.

GAMARRA, S.; ROCHA, E.M.F, ZHANG, Y.Q.; PARK, S.; RAO, R.; PERLIN, D.S. Mechanism of the Synergistic Effect of Amiodarone and Fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.54, p.1753-1761,2010.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n.3, p.401-405, 2003.

GRACY, R. W.; TALENT, J. M; KONG, Y.;CONRAD, C. C.; Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat. Res.* 428(1-2): 17-22, 1999.

GUO, J.; SONG, W.; DING, F.; ZHANG, J.; SUN. Z. Study on cytotoxicity and structure–activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones. *Environmental toxicology and pharmacology*. 33: 408–413, 2012.

HUGHES, L.M.H.; LANTERI, C.A.; O'NEIL, M.T.; JOHNSON, J.D.; GRIBBLE, G.W; TRUMPOWER,B.L. Design of anti-parasitic and anti-fungal hydroxy-naphthoquinones that are less susceptible to drug resistance. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 177: 12–19, 2011.

IBIS, C.; TUYUN, A.F.; OZSOY-GUNES, Z.; BAHAR, H.; STASEVYCH, M.V.; MUSYANOVYCH, R.Y; KOMAROVSKA-POROKHNYAVETS, O.; NOVIKOV, V. Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen- and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 5861- 5867, 2011.

IBIS, C.; TUYUN, A.F.; OZSOY-GUNES,, Z.; BAHAR, H.; STASEVYCH, M.V.; MUSYANOVYCH, R.Y; KOMAROVSKA-POROKHNYAVETS, O.; NOVIKOV, V. Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen- and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 5861- 5867, 2011.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, v.56, p.211-224, 2009.

KOTHAVADE, M.M.; RAJENDRA, J.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, v.59, p.873–880, 2010.

KUMAGAI, Y.; SHINKAI, Y.; MIURA, T.; CHO, A.K. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 52: 221–247, 2011.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M.P.; TÄUBER, M.G.; PIPET, D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: Secular trends, 1991-2000. *Clinical Infection Disease*, v.38, n.3, p.311-320, 2004.

MARTIN, G.S., D. M. MANNINO, S. EATON, and M. MOSS. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*, v.348, p.1546-1554, 2003.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.48, n.1,p.17-20, 2006.

MENEZES, E.A; MENDES. L.G; CUNHA,F.A. Antifungal resistance of *Candida tropicalis* isolated in the State of Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.3, p354-355, 2009.

MÜLLER, R.H., JACOBS, C. Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *Int. J. Pharm.*151–161, 1-2. 2002.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.1399–1412, 2012.

NUCCI M, COLOMBO AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.58, p.77-82, 2007.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; ALCOBA, J.; GINEA, J.; MERINO, P.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; LINARES-SICILIA, M.J.; MARCO, F.; KIRAZ, N.; DAG, I.; OZ, Y.; YAMAC, M.; KIREMITCI, A.; KASIFOGLU, N. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *Journal of Microbiology Methods*, v.82, p.136–140, 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Review*, v.20, p.133-163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiologic Cutoff Values for Fluconazole and *Candida*: Time for New Clinical Breakpoints? *Current Fungal Infection Report*, v.4, p.168–174, 2010.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry. *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi, Methods in Molecular Biology*, v.638, 2010.

RAJESHKUMAR, R. AND SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – *status quo*. , v.55, p.60-73, 2012.

RAVELO, A.G.; BRAUN, A.E.; PEREZ-SACAU, E. The chemistry and biology of lapachol and related natural products a and (3-Lapachones). *Studies in Natural Products Chemistry*. vol. 29, p.719-760, 2003.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: Practical Aspects and Current Challenges, *Clinical Microbiology Reviews* v. 14, n. 4, p. 643–658, 2001.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, E. A. P. ; KUBOTA L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, 24 (1): 112- 119 2001.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist*, v.17, n.2, p.74-78, 2003.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Host-microbe interactions: fungi* v.5, p.379–385, 2002.

SASAKI, K.; ABE, H.; YOSHIZAKI, F. *In Vitro* Antifungal Activity of Naphthoquinone Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (5): 669-670, 2002.

SCHMALRECK, A. F.; WILLINGER, B.; HAASE, G.; BLUM, G.; FEGELER, W.; BECKER, K.. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study for the Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. *Mycoses*, v. 55, p.124–137, 2012.

SILVA, R.S.F.; COSTA, E.M.; TRINDADE, U.L.T.; TEIXEIRA, D.V.; PINTO, M.C.F.R.; SANTOS, G.L.; MALTA, V.R.S.; SIMONE, C.A.; PINTO, A.V.; CASTRO, S.L. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 41:526–530, 2006.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v.36, p.288–305, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v.36, p.288–305, 2012.

SHUKLA, S.; SRIVASTAVA, R.S.; SHRIVASTAVA, S.K.; SODHI, A.; KUMAR, P. Synthesis, Characterization and Antiproliferative Activity of 1, 2-Naphthoquinone and Its Derivatives. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012.

TONHOLO, J.; FREITAS, L. R.; ABREU, F. C.; AZEVEDO, D. C.; ZANI, C. L.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F. Electrochemical Properties of Biologically Active Heterocyclic naphthoquinones. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 9, n. 2, p. 163-169, 1998

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGES, T.; RENIER, G.; CHABASSE, G.; BOUCHARA, G.P. Mechanisms of Azole Resistance in a Clinical Isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 4608–4615, 2005.

VOLLMER, T.; STÖRMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. Evaluation of Novel Broad-Range Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Human Pathogenic Fungi in Various Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 46(6) 1919–1926, 2008.

YANG, Y-L. Virulence Factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 36, p. 223-228, 2003.

ANEXOS

Anexo I – FIGURAS E TABELAS

Anexo II – COMITÊ DE ÉTICA

Anexo III– CERTIFICADO EDITORIAL

ANEXOS I

Figura 1

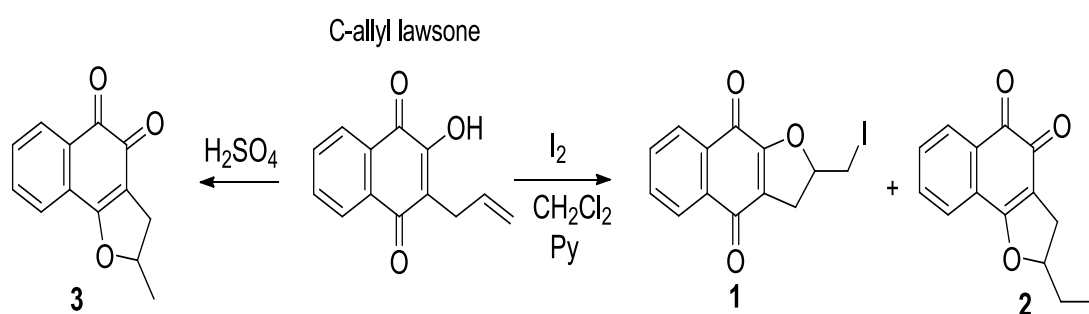


Figure 1. The synthesis of compounds 1, 2 and 3.

Fonte: Silva *et al.* 2006

Figura 2

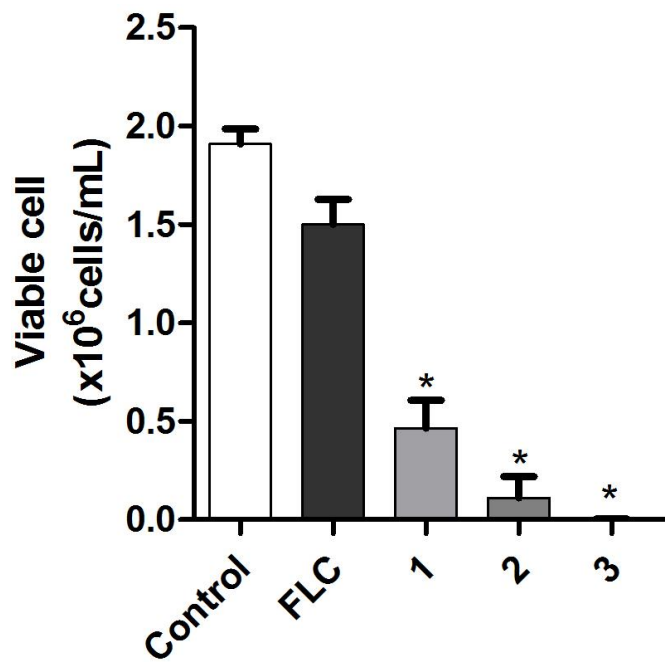


Figure 2. A flow cytometric analysis of the reduction in cell number to reveal the synergistic effects of fluconazole (64 mg/L) and naphthofuranquinone (NFQ) compounds 1, 2 and 3 (128 mg/L) on isolates of FLC-resistant *C.tropicalis* after a 24 h incubation. *P<0.05 compared with the control using an ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figure 3

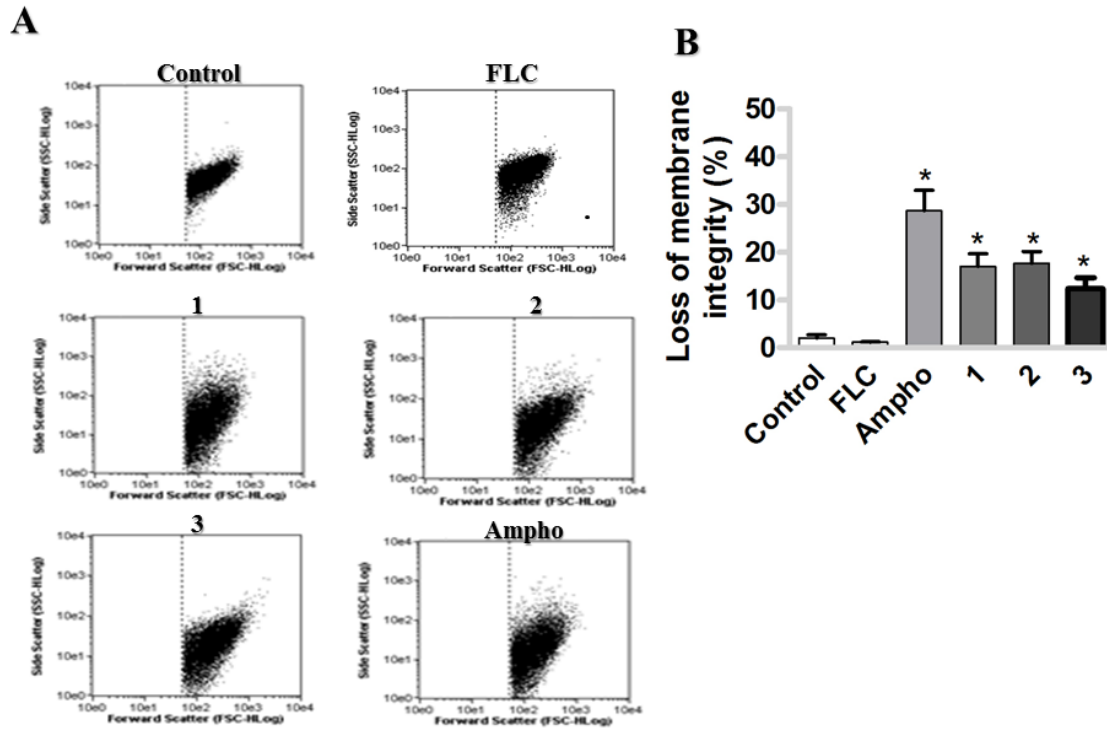


Figure 3. An analysis of changes in cell size/granularity (FSC x SSC) (A) and membrane integrity (B) as determined with a PI exclusion test to evaluate the effects of fluconazole (64 mg/L), Ampho (4 mg/L) and naphthofuranquinone (NFQ) compounds 1, 2 and 3 (128 mg/L). Fluconazole-resistant *C.tropicalis* isolates, for a period of 24 hours. * P <0.05 compared to the control using an ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figura 4

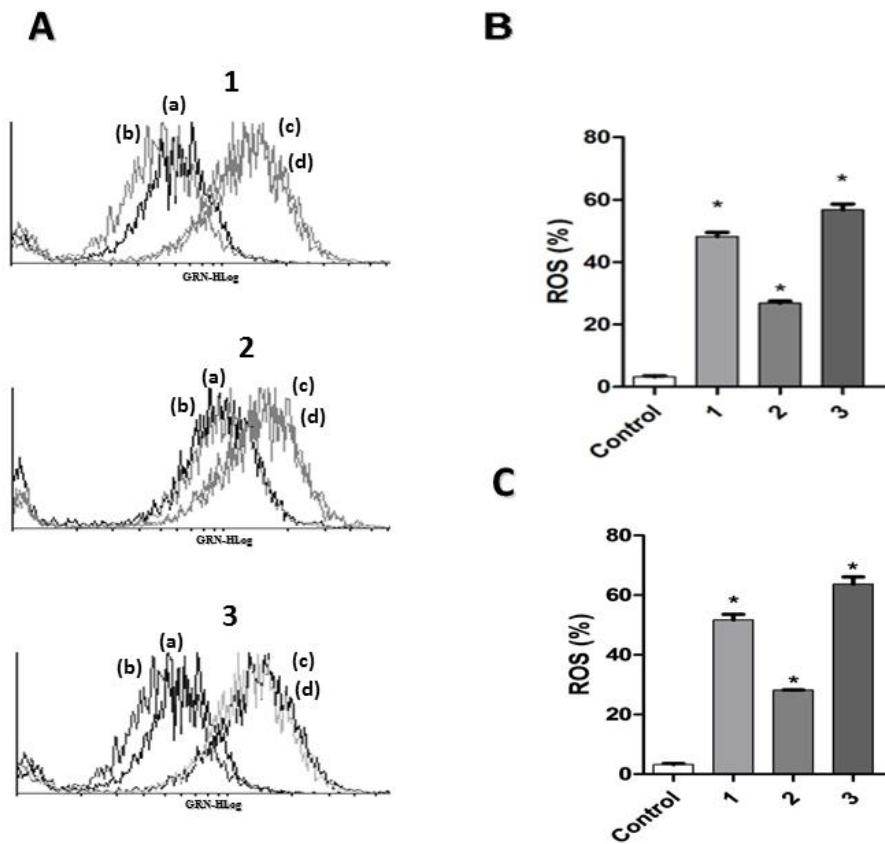


Figure 4. An evaluation of ROS formation in untreated fluconazole-sensitive a) and fluconazole-resistant b) *C.tropicalis* isolates, as well as in fluconazole-sensitive c) and fluconazole-resistant d) isolates after treatment with naphthofuranquinone (NFQ) compounds 1, 2 and 3 (128 mg/L) A) for 24 hours. The percentage of ROS formation in the fluconazole-sensitive B) and fluconazole-resistant *C.tropicalis* isolates C) was evaluated for 24 hours. *P < 0.05 compared with the control using an ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figura 5

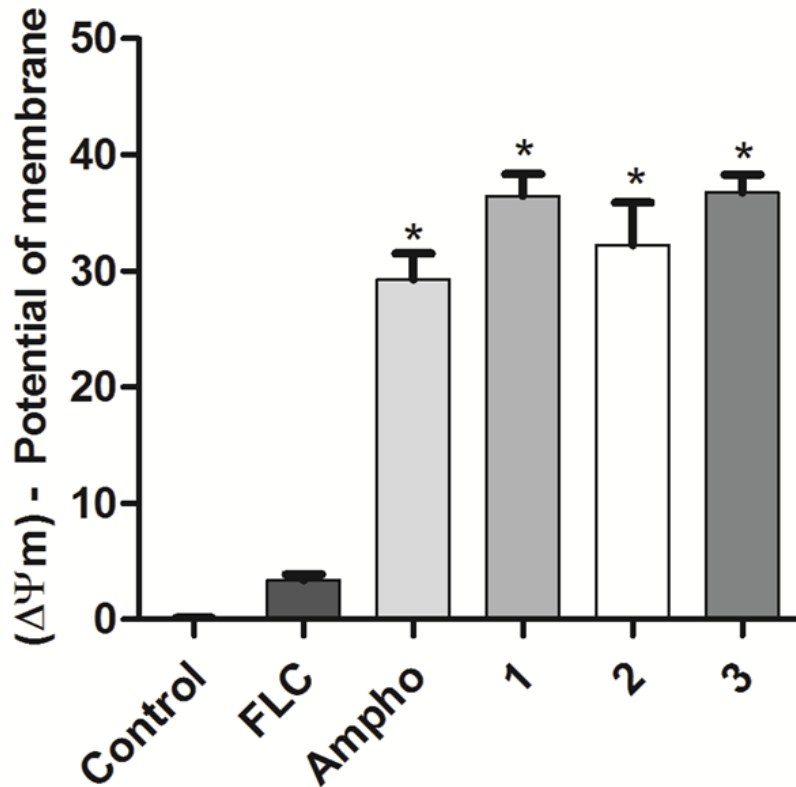


Figure 5. An assessment of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of fluconazole-resistant *C. tropicalis* strains. The cells were labelled with Rh123 (50 nM). The graph shows strains incubated for 24 hours with RPMI (control), with FLC (64 mg/L) and Ampho (2 mg/L) and with naphthofuranquinone (NFQ) compounds 1, 2 and 3 (128 mg/L). * $P < 0.05$ compared with the control using an ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figura 6

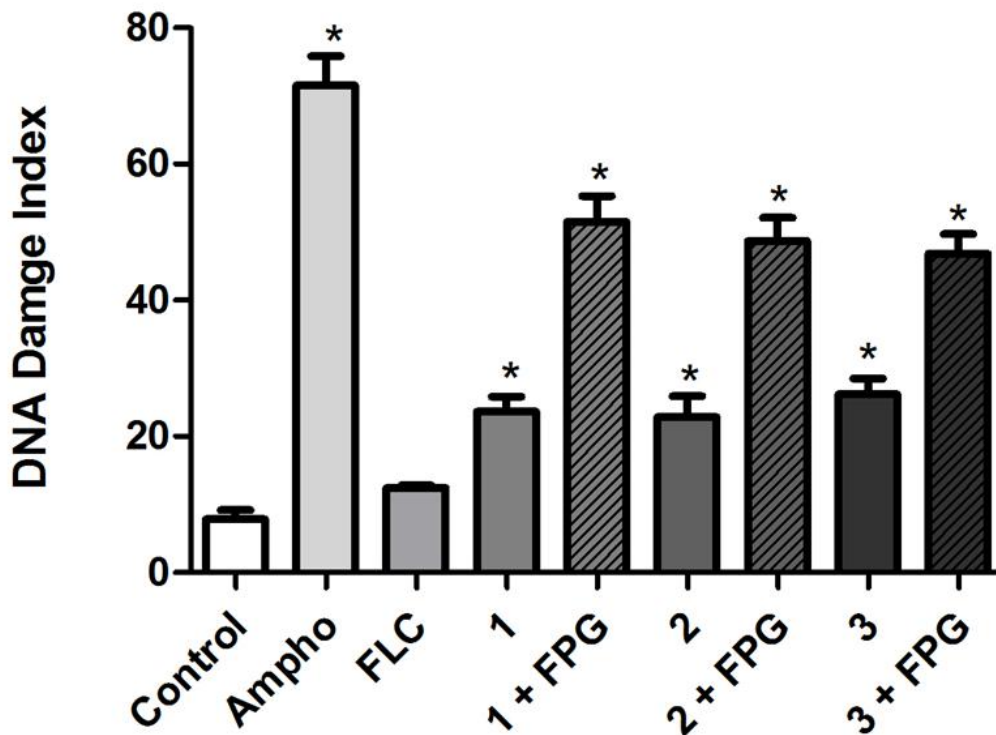


Figure 6. The effects of 24 h incubations with FLC (64 mg/L), Ampho (4 mg/L), and naphthofuranquinone (NFQ) compounds 1, 2 and 3 (128 mg/L) on the DNA damage index and the levels of oxidative DNA damage in FLC-resistant strains of *C. tropicalis*. The alkaline and modified alkaline versions of the comet assay were used. * $P < 0.05$ compared with the control using an ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

TABELA 1

Table 1. The effects of naphthoquinoidal compounds (NFQs) 1, 2 and 3 against FLC-resistant strains of *C. tropicalis* isolated in Ceará (MIC 50% at 48 h).

Strains ^a	MIC ^b			
	Standard MIC			
	FLC ^b (µg/mL) MIC ₅₀ 48 h ^c	1(µg/mL) MIC ₅₀ 48 h	2(µg/mL) MIC ₅₀ 48 h	3(µg/mL) MIC ₅₀ 48 h
<i>C. tropicalis</i> 1	>64	25.40	25.40	25.40
<i>C. tropicalis</i> 2	>64	32	25.40	20.15
<i>C. tropicalis</i> 3	>64	20.15	32	10.10
<i>C. tropicalis</i> 4	>64	25.40	25.40	16
<i>C. tropicalis</i> 5	>64	40.32	25.40	32
<i>C. tropicalis</i> 6	>64	64	40.32	40.32
<i>C. tropicalis</i> 7	>64	64	40.32	40.32

^aFLC-resistant strains of *Candidatropicalis* isolated from biological samples.

^bFLC – fluconazole; compounds(1-3) – NFQs. The MIC was defined as the lowest concentration that produced a 50% reduction in the growth of fungal cells after 48h of incubation. The microdilution in broth was performed according to CLSI protocol M27-A3. The FLC concentrations ranged from 0.125-64µg/mL, and the compounds(1-3) concentrations varied from 0.25-128 µg/MI. The MICs represent the geometric means of at least three MICs determined on different days^c.

COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, sendo aprovado pelo parecer Nº **39/12**, cumprindo as determinações da Resolução 196/96.



EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against strains of *C. tropicalis* resistant to fluconazole

Authors:

João B. A. Neto, Cecília R. da Silva, Maria A. S. Neta, Janaína T. Siebra, Rose A. C. Silva, Hemerson I. F. Magalhães, Bruno C. Cavalcanti, Manoel O. de Moraes, Marina D. P. Lobo, Thalles B. Grangeiro, Tatiane S. Carvalho, Emilly B. T. Diogo, Eufrânio N. da Silva Júnior and Hélio V. N. Júnior

Date Issued:

October 24, 2012

Certificate Verification Key:

D246-4E65-B4A7-D81B-B764



This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com.