

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANDRESSA SOUZA DE OLIVEIRA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE INIBIDORES HDACs PLANEJADOS A
PARTIR DO CARDANOL E ÁCIDO ANACÁRDICO

BRASÍLIA

2022

Andressa Souza de Oliveira

Síntese e Avaliação Antifúngica de Inibidores HDACs Planejados a partir do
Cardanol e Ácido Anacárdico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Luiz Antonio Soares Romeiro

Brasília-DF

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

ANDRESSA SOUZA DE OLIVEIRA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE INIBIDORES HDACs PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL E ÁCIDO ANACÁRDICO

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ de _____ de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro – UnB

Prof. Dr. Ricardo Menegatti – UFG

Prof^a. Dr. Maria Sueli Soares Felipe – UCB

Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca – UnB

Prof^a. Dr. Yanna Karla Nóbrega de Medeiros – UnB

AGRADECIMENTOS

Um dia eu sonhei em fazer grandes descobertas e contribuir com o desenvolvimento da sociedade. Ser cientista é percorrer por um caminho, que ao contrário do que pensam, não se desenvolve de forma solitária. Agradeço aos meus pais, Maria das Graças de Souza e Anísio Alves de Oliveira, que sempre sonham os meus sonhos e não medem esforços para me apoiar, incentivar e me fortalecer através do amor.

Ao iniciar minha jornada científica, no curso de Química, as possibilidades de áreas me fascinavam, no entanto, foi por meio do altruísmo e domínio de conhecimentos do professor Luiz Antonio Soares Romeiro, que eu fui “fiscada” para a área da Química Medicinal. Agradeço pelo exemplo, pela sua empolgação com o conhecimento, pela liberdade que proporciona aos seus alunos para desenvolverem o estudo que desejam, pela sua dedicação quando se aventura em projetos mais diversos. Agradeço pelas oportunidades, pela troca de conhecimento científico e filosófico, bem como pela amizade. Muito obrigada!

Antes de ingressar no doutorado tive a oportunidade de participar de projeto de pesquisa (PRONEX), coordenado pela professora Maria Sueli Soares Felipe, onde fui absorvida pelo universo das doenças fúngicas. No mesmo momento, tive contato com a professora Fabiana Alves Silva Brandão, que trabalhava com os mecanismos epigenéticos. E foi nesse momento que agucei ideias e abracei a proposta desse projeto. Meus sinceros agradecimentos às duas professoras, que são exemplos de mulheres na ciência que estimulam e encantam com o seu conhecimento.

Agradeço a professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e aos seus alunos Jonathas Oliveira e Mirele Fernandes, que acreditaram na nossa proposta e contribuíram com a realização dos ensaios fúngicos. Agradeço à professora Patrícia Albuquerque pela disponibilidade dos testes *in vivo*. Agradeço ao professor Edilberto Silveira pela realização dos espectros de ressonância magnética.

Agradeço aos colegas do LDT pelo conhecimento compartilhado, agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por

contribuírem para a minha formação. Agradeço aos funcionários do Núcleo de Medicina Tropical, sempre tão gentis e dispostos a ajudar no que foi necessário.

Além de todos que contribuíram diretamente na execução deste projeto, também foram necessários apoio, carinho, momento de descontração e incentivo para desenvolver este estudo em um período atípico e assolador pela pandemia da COVID-19. Agradeço as minhas tias Waldelice Camargo e Valdete Cabral, ao meu irmão Alex Souza de Oliveira, que sempre tiveram presentes com uma palavra de carinho.

Agradeço aos amigos que fizeram e fazem parte da minha jornada científica, sempre dispostos a dar um apoio e partilhar momentos de alegrias e acolhimento. Agradeço em especial à Natane Castelo Branco Duarte, que também doutoranda, compartilhamos além de conhecimentos uma amizade de muito apoio e carinho. Agradeço minha amiga, Adeliza Cristina Jorge Estrela, que nunca se ausentou diante dos meus momentos de maiores dificuldades e sempre me estimulou com o seu otimismo.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília que proporcionou a realização desse projeto, e à Capes, pela concessão da bolsa.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”

Marie Curie

RESUMO

A incidência de infecções fúngicas graves tem afetado significativamente milhares de pessoas nos últimos anos, principalmente pacientes imunocomprometidos, ocasionando cerca de 1,6 milhão de óbitos anualmente. Atualmente, os medicamentos antifúngicos apresentam limitações que incluem efeitos adversos e resistência a patógenos. Estudos com moduladores epigenéticos da classe dos inibidores de histona desacetilases têm sido explorados como estratégia terapêutica ou sinérgica juntamente com agentes antifúngicos. Este trabalho descreve a síntese e caracterização de dois novos inibidores da histona desacetilase, LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**), elaborados a partir de cardanol e ácido anacárdico. Avaliou-se a atividade antifúngica em células planctônicas e formação de biofilme de fungos patogênicos – *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix brasiliensis* – bem como a toxicidade *in vitro* em células RAW264.7 e *in vivo* no modelo de *G. mellonella*. Os testes de suscetibilidade contra células planctônicas mostram que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) variaram de 32-64 µg/mL para o composto **25** e de 8-64 µg/mL para o composto **26**. Em seguida, a interação sinérgica entre os antifúngicos azólicos (fluconazol, voriconazol e itraconazol) e o composto **26**, o que levou a uma diminuição das concentrações de azóis de 2 para 256 vezes. Em relação à ação sobre os biofilmes, observou-se reduções de mais de 50% para *C. albicans* (4 µg/mL) e *S. brasiliensis* (16 µg/mL). Em ensaios de toxicidade *in vitro*, em células RAW 264.7, o composto **25** apresentou citotoxicidade na concentração máxima de 200 µM (53,07 µg/mL), enquanto **26** foi citotóxico em 6,25 µM (2,02 µg/mL). Finalmente, os compostos não apresentaram toxicidade no modelo *in vivo* de *Galeria mellonella* até uma concentração de 1200 µg/mL. Os resultados indicam potencial atividade antifúngica e antibiofilme dos compostos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) planejados como candidatos a agentes terapêuticos sustentáveis e de baixo custo elaborados a partir dos lipídios fenólicos presentes no líquido da casca da castanha de caju.

Palavras-chave: agentes antifúngicos, inibidores de histonas desacetilases, cardanol, ácido anacárdico, LCC, sustentabilidade.

ABSTRACT

The incidence of severe fungal infections has significantly affected thousands of people in recent years, especially immunocompromised patients causing a high number of deaths. Currently, antifungal drugs have limitations that include adverse effects and pathogen resistance. Studies with epigenetic modulators of the histone deacetylase inhibitors class have been explored as a therapeutic or synergistic strategy along with antifungal agents. This work describes the synthesis and characterization of two new histone deacetylase inhibitors, LDT536 (**25**) and LDT537 (**26**), designed from cardanol and anacardic acid. We also evaluate antifungal activity in planktonic cells and biofilm formation of pathogenic fungi – *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* and *Sporothrix brasiliensis* – as well as the *in vitro* toxicity in RAW 264.7 cells and *in vivo* in *G. mellonella* model. The susceptibility tests against planktonic cells showed the minimum inhibitory concentrations (MICs) ranged from 32-64 µg/mL for compound **25** and from 8-64 µg/mL for compound **26**. Then, we evaluated the synergistic interaction among antifungal azoles (fluconazole, voriconazole, and itraconazole) and compound **26**, which led to a decrease in azole concentrations from 2 to 256 times. Regarding the action on biofilms, we observed reductions of more than 50% for *C. albicans* (4 µg/mL) and *S. brasiliensis* (16 µg/mL). In *in vitro* toxicity assays, in RAW 264.7 cells, compound **25** showed cytotoxicity at the maximum concentration of 200 µM (53.07 µg/mL), while **26** was cytotoxic at 6.25 µM (2.02 µg/mL). Finally, the compounds showed no toxicity in the *in vivo* model up to a concentration of 1200 µg/mL. The results indicate potential antifungal and antibiofilm activity of the compounds LDT536 (**25**) and LDT537 (**26**) planned as candidates for sustainable and low-cost therapeutic agents designed from the phenolic lipids present in the cashew nut shell liquid.

Keywords: antifungal agents, histone deacetylase inhibitors, cardanol, anacardic acid, CNSL, sustainability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Invasão e disseminação do fungo para a corrente sanguínea	26
Figura 2	– Estados morfológicos de <i>C. albicans</i>	28
Figura 3	– Ciclo de transmissão do <i>C. neoformans</i>	30
Figura 4	– Ciclo de transmissão do <i>Sporothrix</i> spp.	31
Figura 5	– Estrutura química dos principais agentes antifúngicos das classes polienos, azóis, equinocandinas e fluoropirimidina	33
Figura 6	– Estrutura química do tavaborol (8).	34
Figura 7	– Estrutura do nucleossomo	38
Figura 8	– Estrutura básica da cromatina	39
Figura 9	– Mecanismo de transferência de grupo acetila pelas HATs	40
Figura 10	– Acetilação e desacetilação de lisinas catalizadas por HAT e HDAC	41
Figura 11	– Domínios de similaridade das histonas desacetilases	42
Figura 12	– Dendrograma representando a relação filogenética de leveduras e HDACs humanos.	43
Figura 13	– Exemplos de inibidores HDAC	44
Figura 14	– Formação de quelatos com o sítio ativo de zinco	45
Figura 15	– Representação gráfica do arcabouço estrutural dos inibidores HDAC's clássicos.	45
Figura 16	– Estruturas químicas da mistura de lipídeos fenólicos encontrados no LCC	46
Figura 17	– Estrutura Markush numerada dos intermediários pós-ozonólise e compostos finais.	58
Figura 18	– Anacardato de cálcio (Ca^{2+} [LDT11i] ²⁻ , 36)	78
Figura 19	– Separação dos principais componentes do LCC natural	78
Figura 20	– Espectro de RMN de ¹ H referente ao assinalamento das metoxilas 29 e 30 em relação aos seus precursores	79
Figura 21	– Mecanismo geral de formação dos ozonídeos primários e secundários.	80

Figura 22	– Espectros de RMN de ^1H e em torno de 63,0 ppm nos espectros de RMN de ^{13}C dos derivados 27 e 28	81
Figura 23	– Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do derivado 23 e espectros de RMN de ^1H do derivado 24	84
Figura 24	– Mecanismo geral da reação de esterificação via $\text{S}_{\text{N}}2$	85
Figura 25	– Mecanismo geral da síntese de aminólise com hidroxilamina	87
Figura 26	– Hidrólise regioseletiva do composto 32 para o 24	91
Figura 27	– Representação do espaçador dos compostos 25 e 15	94
Figura 28	– Estudo de docagem molecular do LDT536 (25)	96
Figura 29	– Sensibilidade biofilmes em formação de <i>Candida</i> spp. ao composto LDT 537. (A) <i>C. albicans</i> ATCC 10231. (B) <i>C. tropicalis</i> ATCC 750.	103
Figura 30	– Sensibilidade de biofilmes em formação de <i>Candida</i> spp. dos compostos LDT537 (26) e SAHA (15) para <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (A e C) e <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 (B e D).	104
Figura 31	– Inibição da biomassa total de biofilme de cepas de <i>Candida</i> spp., <i>C. neoformans</i> e <i>S. brasiliensis</i> (forma filamentosa)	107
Figura 32	– Imagens obtidas utilizando microscopia eletrônica de varredura de biofilme de <i>Candida albicans</i> formado na presença de diferentes concentrações do composto LDT 537 (26)	109
Figura 33	– Efeito dos compostos LDT536 (A) e LDT537 (B) na viabilidade celular em células RAW 264.7	110

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** – Planejamento de novos HDACi planejados a partir dos derivados fenólicos do LCC **50**
- Esquema 2** – Análise retrossintética para obtenção dos compostos-alvos **52**
- Esquema 3** – Rota sintética empregada na obtenção dos compostos-alvos **53**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composições químicas dos LCC natural e técnico	47
Tabela 2 –	Composição percentual relativa de insaturações nos constituintes fenólicos do LCC obtida por CG/MS	47
Tabela 3 –	Cepas e espécies fúngicas usadas para o teste de sensibilidade	70
Tabela 4 –	Misturas O-metiladas LDT27i (29) e LDT28i (30): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C	80
Tabela 5 –	Álcoois LDT72 (27) e LDT74 (28): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C	82
Tabela 6 –	Ácidos LDT80 (23) e LDT394 (24): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C.	85
Tabela 7 –	Ésteres metílicos LDT483 (31) e LDT395 (32): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C.	86
Tabela 8 –	Ácidos hidroxâmicos LDT536 (25) e LDT537 (26): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C.	88
Tabela 9 –	Sensibilidade <i>in vitro</i> de diferentes espécies fúngicas aos compostos LDT536 (25) e LDT537 (26)	99
Tabela 10 –	Avaliação da interação sinérgica do composto LDT 537 (26), SAHA (15) e compostos azólicos	101
Tabela 11 –	Inibição da formação de biofilme em cepas de <i>Candida</i> spp., <i>C. neoformans</i> , de <i>S. brasiliensis</i> (forma filamentosa)	106
Tabela 12 –	Toxicidade dos compostos 26 e 27	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ –	Deslocamento químico
AcOEt –	Acetato de etila
ATCC –	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD –	Cromatografia em camada delgada
CP –	Controle Positivo
CIM –	Concentração inibitória mínima
CIMS –	Concentração inibitória mínima de células sésseis
CNA –	<i>Candida não albicans</i>
DCM –	Diclorometano
dd –	Duplo duplete
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
EtOH –	Etanol
FDA –	<i>Food Drug Administration</i>
HAT –	Histona acetiltransferase
HDAC –	Histona desacetilase
HDACi –	Inibidor de histona desacetilase
HIV –	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hz –	Hertz
IC –	Isolado clínico
ICIF –	Índice de concentração inibitória fracionada
IF –	Infecções fúngicas

IFI –	Infecções fúngicas invasivas
IGF –	Interconversão de grupos funcionais
<i>J</i> –	Constante de acoplamento
KAT –	Lisina acetiltransferase
KDAC –	Lisina desacetilase
LCC –	Líquido da casca da castanha de caju
<i>m</i> –	Multiplete
MeCN –	Acetonitrila
MeOH –	Metanol
MPT –	Modificações pós-traducionais
MTT –	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
PCC –	Clorocromato de piridínio
REA –	Relação Estrutura-Atividade
<i>R_f</i> –	Fator de retenção
RMN –	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C –	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H –	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i> –	Simpleto
<i>sl</i> –	Sinal largo
SNC –	Sistema nervoso central
<i>t</i> –	Triplete
TEA –	Trietilamina
TMS –	Tetrametilsilano
UV –	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	24
2.1 Estimativas das infecções fúngicas: aspectos gerais.....	24
2.2 Infecções fúngicas causadas por <i>Candida</i> spp.....	26
2.3 <i>Candida albicans</i>	27
2.4 Espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> (CNA)	28
2.5 Infecções fúngicas causadas por <i>Cryptococcus neoformans</i>	29
2.6 Infecções fúngicas causadas por <i>Sporothrix brasiliensis</i>	31
2.7 Fatores de virulência.....	32
2.8 Terapêutica antifúngica	34
2.9 O uso de sinergismo na terapia antifúngica	36
2.10 Mecanismos epigenéticos.....	38
2.10 Histonas acetiltransferases	41
2.11 Histonas Desacetilases (HDACs).....	42
2.12 Inibidores das Histonas Desacetilases (HDACi)	45
2.13 Derivados fenólicos do líquido da casca da castanha de caju (LCC).....	47
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	51
4. ESTRATÉGIA SINTÉTICA	53
4.1 análise retrossintética	53
4.2 Planejamento sintético.....	54
5. OBJETIVOS.....	56
5.1 GERAL.....	56
5.2 ESPECÍFICOS.....	56
6. PARTE EXPERIMENTAL	58

6.1 GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
6.1.1 Hemissíntese orgânica aplicada aos derivados do LCC	58
6.2 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS .	59
6.2.1 Obtenção da Mistura de Cardanois a Partir do LCC Técnico LDT10i (20)....	59
6.2.2 Obtenção da Mistura de Ácidos Anacárdicos a Partir do LCC Natural LDT11i (19):.....	60
6.2.3 O-Metilação das Misturas de Cardanois LDT27i (29) e Ácidos Anacárdicos LDT28i (30).....	61
6.2.4 Obtenção dos Derivados 8-(3-Metóxi-6-fenil)-1-octan-1-ol LDT72 (27) e 2-Metóxi-6-(8-hidróxi-6-fenil)benzoato de metila LDT74 (28) :	62
6.2.6 Obtenção do Ésteres 8-(3-Metóxi-6-fenil)octanoato de metila LDT483 (31), 8-(2-Carbometóxi-3-metóxi)octanoato de metila LDT395 (32):	65
6.2.7 Obtenção dos derivados <i>N</i> -Hidróxi-8-(3-metóxi-6-fenil)octanamida LDT536 (25) e 8-(2-Carbometóxi)- <i>N</i> -hidróxi-8-(3-metóxi-6-fenil)octanamida LDT537 (26):	67
6.3. METODOLOGIA SINTÉTICA DO ESTUDO DE OZONÓLISE	69
6.3.1 Obtenção dos intermediários aldeído 8-(3-Metóxi-6-fenil)-1-octanol (LDT393, 33), Ácido 8-(2-Carbometóxi-3-metóxi)octanoico (LDT394, 24), Éster 8-(2-Carbometóxi-3-metóxi)octanoato de metila (LDT395, 32) 8-(2-Carbometóxi)- <i>N</i> -hidróxi-8-(3-metóxi-6-fenil)octanamida (LDT537, 26):	69
6.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	70
6.4.1 Avaliação do perfil de atividade inibitória em Histonas Desacetilases Humanas (hHDACs).....	70
6.4.2 Avaliação da sensibilidade em espécies fúngicas.....	71
6.4.3 Avaliação do sinergismo entre azóis e hHDACi em células planctônicas	72
6.4.4 Avaliação dos compostos sobre a formação do biofilme fúngico	73
6.4.5 Microscopia eletrônica de varredura	73
6.4.6. Avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7	74
6.4.7 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> em <i>Galleria mellonella</i>	74

6.4.8 Análise estatística	75
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
7.1 Metodologia sintética	77
7.1.1 Obtenção da mistura de cardanois (20) e cardois (21)	77
7.1.2 Obtenção da mistura de ácidos anacárdicos (19)	78
7.1.3 Obtenção das misturas O-metiladas LDT27i (29) e LDT28i (30)	79
7.1.4 Obtenção dos álcoois LDT72 (27) e LDT74 (28).....	81
7.1.5 Obtenção dos derivados ácidos LDT80 (23) e LDT394 (24):.....	84
7.1.6 Obtenção dos derivados metilésteres LDT483 (31) e LDT395 (32):.....	86
7.1.7 Obtenção dos ácidos hidroxâmicos	87
7.1.8 Estudos visando a obtenção do hidroxamato cardólico LDT538 (31)	89
7.1.9 Estudos metodológicos visando otimização de etapas	90
7.2 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE ATIVIDADE <i>in vitro</i>	92
7.2.1 Avaliação do perfil de atividade inibitória de histonas desacetilases humanas (hHDACs).....	92
7.2.2 Estudo de docagem molecular frente a HDAC1 e HDAC6	97
7.2.3 Avaliação da sensibilidade em espécies fúngicas.....	99
7.2.4 Avaliação do sinergismo entre azóis e LDT537(26) em células planctônicas	101
7.2.5 Avaliação da sensibilidade em células sésseis	104
7.2.6 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura.....	108
7.2.7 Ensaio de citotoxicidade	110
7.2.8 Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i>	111
8. CONCLUSÃO.....	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento da incidência de infecções fúngicas representa um grave problema de saúde pública. Essas acometem principalmente indivíduos que estão em terapias contra câncer, imunossuprimidos e transplantados, cuja susceptibilidade está relacionada ao número de óbitos em ambiente hospitalar. As espécies de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* são descritas como principais causadoras de infecções graves e associadas a elevadas taxas mundiais de mortalidade, mesmo considerando diagnósticos negligenciados. Outro fungo emergente que tem gerado preocupações é o *Sporothrix brasiliensis* que apresenta característica zoonótica.

O principal arsenal terapêutico antifúngico compreende as classes dos polienos, pirimidinas fluoradas, azóis e equinocandinas. Os medicamentos representantes das classes não apresentam eficácia adequada e estão relacionados a elevada toxicidade, interações medicamentosas, farmacocinética variável e resistência do patógeno. Para contornar esta situação estudos atuais têm explorado o uso de moduladores epigenéticos – como inibidores de histona desacetilases – como estratégia monoterápica ou em sinergismo com fármacos antifúngicos empregados na clínica.

As histonas desacetilases (HDACs) são enzimas que regulam a estrutura da cromatina afetando as interações com o DNA. Conservadas entre diferentes espécies de células eucariotas, a inibição de HDACs consiste em estratégia promissora para o planejamento de novos agentes antifúngicos capazes de diminuir a virulência e, ou a resistência destes microrganismos.

O arcabouço molecular de inibidores HDAC dependentes de Zn^{2+} compreendem três subunidades: a subunidade auxofórica de reconhecimento de superfície (CAP), a subunidade farmacofórica quelante de íon zinco (ZBG); e o espaçador hidrofóbico, com 6 a 14 átomos de carbono, que une o CAP e o ZBG. Duas dessas características estruturais, o CAP e o espaçador hidrofóbico, são encontradas nos lipídeos fenólicos do líquido da casca da castanha de caju (LCC), caracterizando-o como possível arcabouço molecular para o planejamento racional de agentes dessa classe terapêutica.

O LCC, obtido a partir da casca da castanha de *Anacardium occidentale*, é uma fonte renovável rica em misturas de lipídeos fenólicos, sendo, portanto, estratégica para o desenvolvimento de fármacos sustentáveis. A sua principal composição é dada por misturas de ácidos anacárdicos, cardois, cardanois e 2-metilcardois. Considerando-se os atributos estruturais, estes compostos constituem sistema biofórico natural, compreendendo características eletrônicas e hidrofóbicas como requisitos estruturais relevantes para modificações químicas e o reconhecimento molecular de diferentes alvos terapêuticos.

Neste sentido, o presente estudo visou o planejamento, a síntese e caracterização de inibidores HDAC a partir dos lipídeos fenólicos do LCC, e a avaliação antifúngica frente a espécies de *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix brasiliensis* por meio de ensaios de sensibilidade antifúngica direta e sinérgica com antifúngicos azólicos utilizados na clínica, bem como efeito sobre biofilmes das espécies supracitadas.

Referencial Bibliográfico

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Estimativas das infecções fúngicas: aspectos gerais

As infecções fúngicas relacionam-se a amplo espectro de doenças que incluem desde uma infecção superficial a infecções fúngicas invasivas (IFI) mais graves, as quais são dependentes do estado imunológico do hospedeiro (LEE, et al., 2019). As tendências epidemiológicas demonstram aumentos dramáticos na incidência de IFI, bem como o surgimento de novos fungos multirresistentes em virtude da baixa curabilidade e aumento da morbidade e mortalidade, bem como, baixa adesão do paciente (SEAGLE, 2021).

De acordo com o Fundo Global de Ações Contra Infecções Fúngicas (GAFFI.org, 2019), aproximadamente 300 milhões de pessoas sofrem com alguma infecção fúngica grave e 25 milhões apresentam risco de morte. Comumente, a população mais afetada pelas infecções invasivas se encontra em unidades de terapia intensiva sob regime terapêutico imunossupressor, em tratamento de câncer, como transplantados, portadores de HIV e diabéticos (PERLIN, SHOR e ZHAO, 2015). As estimativas globais baseiam-se nas condições socioeconômicas de cada região e no índice de outras patologias associadas às infecções fúngicas (GIACOMAZZI, et al., 2016).

Alterações epidemiológicas relacionadas às IFI são observadas como consequência de desastres naturais, como a pandemia da COVID-19 em curso causada pelo vírus SARS-CoV-2. Neste contexto, longos períodos de internação e inoculação iatrogênica levam ao aumento de hospedeiros imunocomprometidos (DABAS, 2021; THYAGARAJAN, MONDY e ROSE, 2021).

As infecções fúngicas (IF) são agravadas na presença de doenças que exigem profilaxia medicamentosa e causam imunossupressão, bem como, pela não obrigatoriedade de relato às agências de saúde pública. A falta de recursos, associada a diagnósticos subestimados impede a obtenção dos dados mais precisos sobre a incidência e a prevalência dessas doenças. Neste sentido, essas infecções têm sido

perenemente negligenciadas, com taxa global de aproximadamente 1,6 milhão de óbitos anuais (JANBON et. al., 2019; FIRACATIVE, 2020; SEAGLE, et al. 2021).

Há relatos que 90 % das espécies frequentemente isoladas causadoras de IFI são dos gêneros *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix* spp. e *Aspergillus* spp. A espécie *C. albicans* é responsável por 40 % das infecções sistêmicas, estimadas em mais de 750 mil casos anuais e apresentando taxa de mortalidade entre 45 % a 75 %, ou seja, quantitativo maior que 350 mil mortes relacionado à *Candida* invasiva (RODRIGUEZ e DENNING, 2017; GAFFI.org, 2019; ZHU, et al., 2021).

Por sua vez, *C. neoformans*, um dos fungos associado à elevada taxa de mortalidade e atinge principalmente em pacientes infectados por HIV, é responsável por cerca de 600 mil mortes anuais com 60 % dos casos em países em desenvolvimento (DEBERALDINI e SANTOS, 2021; IYER, et al., 2021; ZHU, et al., 2021). Estima-se que ocorram globalmente, a cada ano, aproximadamente 223 mil casos de meningite criptocócica levando a cerca de 180 mil mortes. A maioria das mortes é relatada em países com recursos limitados devido à falta de acesso a medicamentos e ao alto custo de tratamentos eficazes (RAJANSINGHAN, et al., 2017; IYER, et al., 2021).

A espécie *S. brasiliensis* emergiu na América do Sul e está associada à transmissão zoonótica, da qual o Brasil vive surto. Esta doença zoonótica, inserida na lista de agravos de notificações das regiões Sul e Sudeste com mais de 4.500 casos, tem chamado a atenção das autoridades em saúde em face da espécie se espalhar por meio do movimento de animais infectados (GERMIÃO, 2020; SEAGLE, 2021).

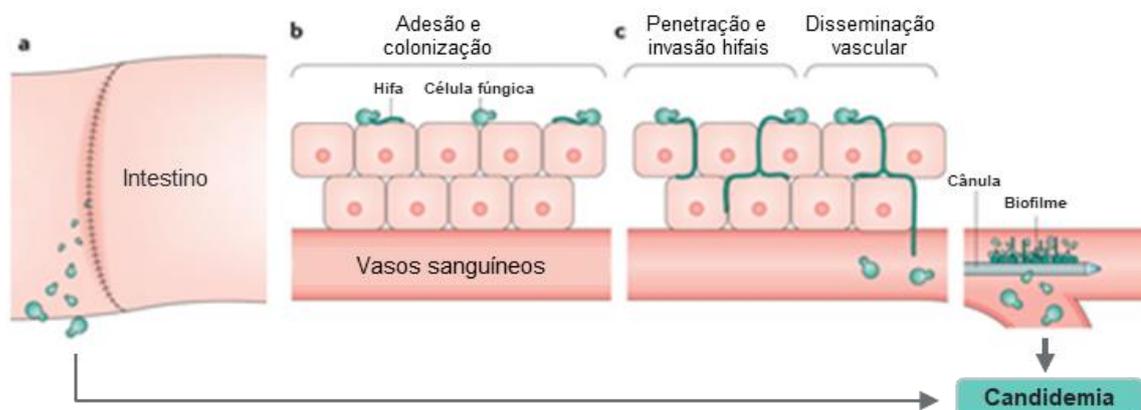
O crescente aumento da resistência medicamentosa pelos fungos é preocupação global uma vez que as infecções fúngicas possuem poucas opções de tratamento, o que afeta não apenas a saúde populacional, mas também os custos em saúde (ZAFAR, et al., 2019). Neste contexto, faz-se necessário tanto o reconhecimento das infecções fúngicas em casos de mortalidade quanto a melhoria nos diagnósticos e atenção epidemiológica sobre estas doenças.

2.2 Infecções fúngicas causadas por *Candida* spp.

As espécies *Candida* spp. são pertencentes ao reino *Fungi*. Este gênero, subdividido em cerca de 150 espécies, consiste em fungos de natureza comensal que em indivíduos saudáveis colonizam mucosas, trato respiratório superior, tratos geniturinário e digestivo, além da pele. No entanto, tornam-se patógenos oportunistas causando diferentes tipos de infecções quando o sistema imunológico do hospedeiro está comprometido (GARCIA et al., 2020; PAPPAS et al., 2018; SADEGHI et al., 2018).

A candidemia, infecção que ocorre na corrente sanguínea, é a forma mais comum da candidíase invasiva associada às maiores taxas de mortalidade nosocomiais, principalmente em pacientes imunocomprometidos, transplantados ou em tratamento quimioterápico (PAPPAS, et al., 2018). A Figura 1 mostra como ocorre a invasão e disseminação do fungo para a corrente sanguínea.

Figura 1: Invasão e disseminação do fungo para a corrente sanguínea.



Legenda: **a**. Quando ocorrem lacunas nas barreiras intestinais (cirurgias) a *Candida* spp. pode disseminar diretamente para a cavidade abdominal e invadir a corrente sanguínea. **b**. Sob condições normais o fungo se comporta como comensal sem causar doenças. **c**. O comprometimento da resposta imune, entre outros fatores, favorece o crescimento e disseminação do fungo, o que pode levar a infecções profundas em diversos órgãos. Fonte: Adaptado de PAPPAS, et al., 2018.

Entre as doenças fúngicas invasivas associadas à *Candida*, as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, e *C. lusitaniae* estão entre as mais patogênicas e representam aproximadamente 90 % dos isolados de cultura de sangue. Nos últimos anos, o número de relatos sobre *Candida auris* tem sido

crescente em alguns países (GARCIA et al., 2020). As infecções ocasionadas por *Candida* spp. variam de acordo com os fatores de virulência (particulares para cada espécie), condições do paciente e infraestrutura do local (KULLBERG et al., 2015; NETEA et al., 2015; BONGOMIN et al., 2017; TSAI et al., 2018; GARCIA et al., 2020).

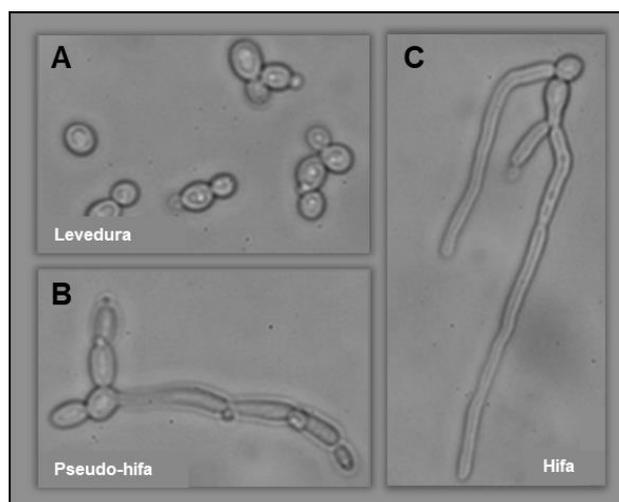
A candidíase invasiva não é uma entidade clínica única, é considerada como distúrbio com inúmeras manifestações, no qual cada espécie de *Candida* possui características próprias em relação ao potencial invasivo, virulência e suscetibilidade a antifúngicos (PAPPAS et al., 2018).

2.3 *Candida albicans*

C. albicans é uma espécie dimórfica caracterizada como fungo oportunista. Descrita pela primeira vez há cerca de 150 anos, *C. albicans* desempenha reprodução assexuada, características morfológicas variáveis e adaptáveis. Encontrada no trato gastrointestinal, boca, pele e aparelho reprodutor, a colonização comensal benigna torna-se patogênica caso o hospedeiro desenvolva imunodeficiência, dano epitelial ou disbiose microbiana (NOBLE, GIANETTI e WITCHLEY, 2017).

A espécie *C. albicans* é descrita como uma das mais patogênicas, responsável por cerca de 37 % a 70 % das infecções fúngicas, atingindo principalmente indivíduos imunocomprometidos. Uma de suas principais características como patógeno é a capacidade de adaptação a condições com deficiência na disponibilidade de nutrientes, pH, hipóxia e níveis de CO₂. Adicionalmente, a espécie apresenta particularidades como a capacidade de alternar a forma de crescimento de levedura (células arredondadas), hifa – caracterizada por cadeias ramificadas e tubulares – e intermediária de pseudo-hifa – que são cadeias de célula de levedura elipsoides com características de levedura e hifas. As formas morfológicas de como *C. albicans* transita são apresentadas na Figura 2 (GOW et al., 2011; DANTAS et al., 2016; BAR-YOSEF et al., 2017; NOBLE, GIANETTI e WITCHLEY, 2017).

Figura 2: Estados morfológicos de *C. albicans*.



Legenda: **A.** Levedura, unicelular com formas ovais. **B.** Pseudo-hifa, com formas arredondadas e ramificadas. **C.** Forma alongada e tubular da hifa. *Fonte:* adaptado de NOBLE, GIANETTI e WITCHLEY, 2017.

A plasticidade morfológica de *C. albicans* – capacidade de realizar a transição levedura para hifa, troca branco-opaco, formação de biofilme, características de adesão e capacidade da formação da parede celular – contribuem para sua virulência e forma mais grave da infecção (GOW et al., 2011; DANTAS et al., 2016; BAR-YOSEF et al., 2017; CORREIA et al., 2019).

2.4 Espécies de *Candida não-albicans* (CNA)

O crescente uso de medicamentos na profilaxia e tratamento de doenças fúngicas está relacionado com o aumento e prevalência das espécies de *Candida não-albicans*, as quais variam de acordo com a localidade e fatores de riscos do indivíduo. Pacientes com distúrbios na microbiota, imunodeficiência, idosos e infecções orais estão relacionados a casos de *C. glabrata* (KASPER et al., 2015). Por sua vez, neonatos, transplantados e indivíduos sob nutrição parental apresentam maior risco para *C. parapsilosis* (WHIBLEY e GAFFEN, 2015). Já as candidíases causadas por *C. tropicalis* são comuns em pacientes que se encontram em unidades de terapia intensiva recebendo antibióticos de amplo espectro ou submetidos a cateterismo prolongado (LIU et al., 2019).

A espécie *C. tropicalis*, emergente principalmente na América Latina e Ásia, apresenta formação de cepas multirresistentes (RAJASEKHARAN et al., 2018; ALVES-ZUZA et al., 2019). A infecção por *C. tropicalis* pode ser adquirida de forma endógena ou exógena e expressar fatores de virulência como adesão a células epiteliais, formação de biofilme, morfogênese e produção de enzimas líticas, além de tolerância ao estresse osmótico e resistência aos antifúngicos utilizados na prática clínica (BONATO et al., 2018; DIBA et al., 2018; TREVINO-RANGEL et al., 2018; ALVES-ZUZA et al., 2019; LIU et al., 2019).

As infecções fúngicas causadas por *Candida* spp., tanto *albicans* e *não-albicans*, são alarmantes principalmente devido à capacidade de adaptação e resistência terapêutica dessas espécies. No entanto, outros fungos, como *C. neoformans* e *S. brasiliensis*, têm chamado a atenção devido às suas patogenicidades (ALVES-ZUZA et al., 2019; LIU et al., 2019).

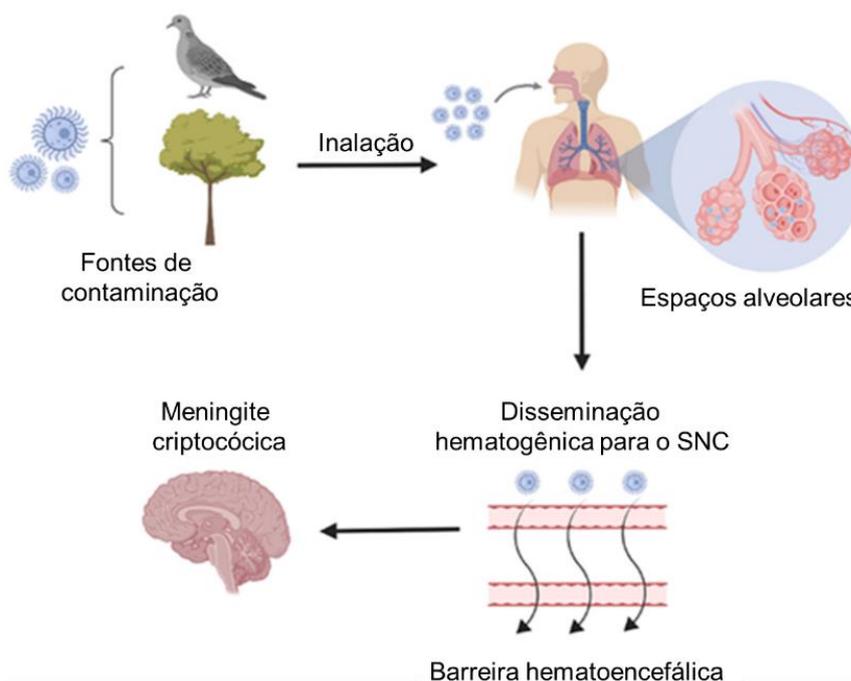
2.5 Infecções fúngicas causadas por *Cryptococcus neoformans*

A criptococose representa uma infecção fúngica invasiva responsável por doenças de elevado risco em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Este patógeno pode provocar lesões graves na pele, pulmão e cérebro, evoluindo para doenças potencialmente fatais como pneumonia e meningoencefalite (TAN, et al., 2021).

No gênero *Cryptococcus*, as espécies *C. neoformans* e *C. gatii* são as principais causadoras de criptococose humana. A espécie *C. neoformans* é responsável por mais de 90 % dos casos de criptococose é associada infecção por HIV em todo o mundo (BANDALIZADEH, et al., 2020). Este fungo pode ser adquirido por meio de fontes ambientais, como excretos de aves, comumente do pombo, solo e árvores. A doença, adquirida por inalação de esporos fúngicos no ar, causa infecção pulmonar (como pneumonia) e em pessoas imunocomprometidas pode disseminar no sistema nervoso central (SNC) ocasionando infecções no cérebro, conhecida como meningite (MAYER e KRONSTAD, 2020). O ciclo de transmissão pode ser observado na Figura 3 (BERMAS e GEDDES-MCALISTER, 2020).

A meningite criptocócica é letal quando não tratada adequadamente. O procedimento terapêutico mais comum é o uso de anfotericina B (1) em combinação com flucitosina (2), seguido pela consolidação monoterápica de fluconazol (3), com resistência frequentemente observada (ZAFAR, et al., 2019). Os fungos *Cryptococcus* spp. são resistentes às equinocandinas e apresentam frequente resistência aos azóis (TAN, et al., 2021; IYER, et al. 2021).

Figura 3: Ciclo de transmissão do *C. neoformans*.



Legenda: Inalação de células ou esporos criptocócicos de fontes ambientais. Os fungos inalados colonizam os espaços alveolares e atravessam a barreira hematoencefálica disseminando para o sistema nervoso central e o desenvolvimento da meningite criptocócica. *Fonte:* Adaptado de BERMAS e GEDDES-MCALISTER, 2020.

C. neoformans, em condições de estresse, passa pela transição morfológica de levedura para hifa associada à fatores epigenéticos. Este produz fatores de virulência, como cápsula de polissacarídeo, termotolerância a 37 °C, melanina na parede celular e enzimas extracelulares, além dos fatores como proteases, fosfolipases, urease, dismutase de superóxido e capacidade de sobreviver dentro de macrófagos no hospedeiro humano (MAYER e KRONSTAD, 2020; ZHAO e LIN, 2021).

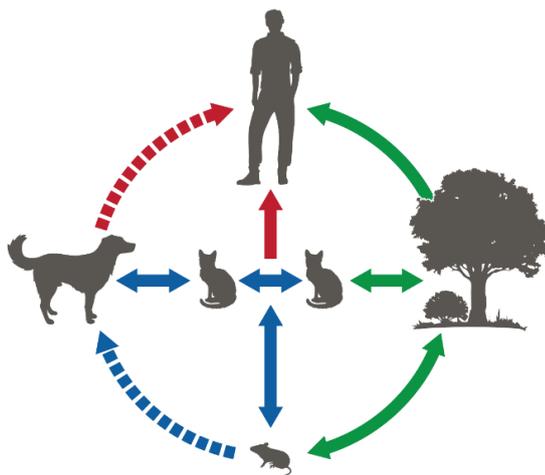
Essa espécie apresenta plasticidade genômica e adaptabilidade fisiológica, o que permite resiliência ao ataque antifúngico. Esses traços podem ser herdados, e muitas vezes são transitórios, de modo que são perdidos quando o estresse é removido. Os antifúngicos são relativamente limitados sendo necessário determinar

novas combinações antifúngicas para aprimorar a eficácia dos tratamentos (IYER, et al., 2021).

2.6 Infecções fúngicas causadas por *Sporothrix brasiliensis*

Sporothrix é um complexo de fungos encontrado no solo, matéria orgânica, plantas e madeiras em decomposição. Presente em diversos países e endêmico no Brasil, representa grave problema de saúde na região do Rio de Janeiro. O *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta e a principal causa da esporotricose felina e humana. Este patógeno representa um problema zoonótico, onde ocorre transmissão do animal para humano, cujo ciclo de transmissão está representado na Figura 4 (IKEDA, et al., 2018; ROSSATO, et al., 2019; ROSSOW, et al., 2020).

Figura 4: Ciclo de transmissão do *Sporothrix*.



Fonte: <https://www.cdc.gov/fungal/port/sporotrichosis/brasiliensis.html>

A esporotricose é uma infecção subcutânea que afeta principalmente os felinos. A gravidade da infecção difere dependendo da espécie e do estado imunológico do hospedeiro. Algumas infecções podem se tornar sistêmicas elevando as taxas de mortalidade, principalmente em hospedeiro imunocomprometido. *S. brasiliensis*, relatada como a espécie mais virulenta, é transmitida por meio da mordida, arranhão ou contato com o exsudato de lesões cutâneas. De forma menos recorrente, também pode ser apresentada por manifestações oftalmológicas como

conjuntivite aguda e crônica, doença do SNC e reações de hipersensibilidade (LOZOYA-PÉREZ, et al., 2020; PAIVA, et al., 2020; ROSSOW, et al., 2020).

Um fator que facilita a transmissão de *S. brasiliensis* entre mamíferos é a sua capacidade de ser transmitida na fase de levedura. *S. brasiliensis* possui dimorfismo térmico e passa por transição morfológica de hifas em temperatura de 25 °C para a forma de levedura parasitária no tecido do hospedeiro (35- 37 °C) (ROSSOW, et al., 2020; DE OLIVEIRA, et al., 2021).

Adicionalmente, *S. brasiliensis*, além de apresentar resistência antifúngica, pode formar biofilmes e se adaptar a ambientes adversos o que faz do tratamento um desafio. Existem poucos medicamentos eficazes disponíveis sendo o itraconazol (4) de uso clínico e, em alguns casos, associado à anfotericina B (1) ou iodeto de potássio (5) (DE SOUZA, et al., 2018; GARCIA, et al., 2020; ROSSOW, et al., 2020; MACHIO-LIMA, et al., 2021; DE OLIVEIRA, et al., 2021).

Os altos custo dos medicamentos, tratamentos de longa duração e resistência pelos patógenos fúngicos de diferentes espécies têm apontado para a fragilidade da terapêutica disponível.

2.7 Fatores de virulência

Virulência é um termo utilizado para definir a capacidade relativa de um micro-organismo causar danos em um hospedeiro, ou seja, é a medida do resultado das interações entre o micro-organismo e hospedeiros. Dessa forma, uma determinante da patogenicidade é o fator de virulência. Os fatores de virulência identificados em fungos patogênicos e permitem a sobrevivência no ambiente e no hospedeiro mamífero, no entanto, não consistem como uma propriedade fixa dos micro-organismos (CASADEVALL, 2007; ZARAGOZA, 2019; CIUREA, et al., 2020).

Os mecanismos de virulência envolvidos em doenças fúngicas invasivas são diferentes e envolvem tanto elementos fúngicos como dos hospedeiros. Alguns dos mecanismos patogênicos são similares em diferentes fungos patogênicos, como a

capacidade de crescer em temperatura fisiológica, resistências aos mecanismos imunológicos, adaptação ao estresse e a diferentes fontes de nutrientes (ZARAGOZA, 2019).

As espécies de *Candida* apresentam estratégias comuns para combaterem os mecanismos de defesa do hospedeiro, entre elas estão: a expressão de moléculas de adesão para a formação de biofilmes, secreção de enzimas hidrolíticas, capacidade de alterar seu estado morfológico, adaptação metabólica, plasticidade genômica e adaptabilidade (CIUREA, et al., 2020). *C. albicans* apresenta polimorfismo, transição da forma comensal para forma patológica, alteração morfológica e formação de biofilmes em superfícies abióticas ou no tecido de hospedeiros, que está relacionado a maioria das infecções ocasionadas por essa espécie. Os biofilmes são clinicamente significativos, pois protegem o fungo contra o alcance dos antifúngicos e podem crescer em dispositivos médicos como cateteres intravasculares, desempenhando papel fundamental no surgimento de infecções hospitalares (CIUREA, et al., 2020; TALAPKO, et al., 2021).

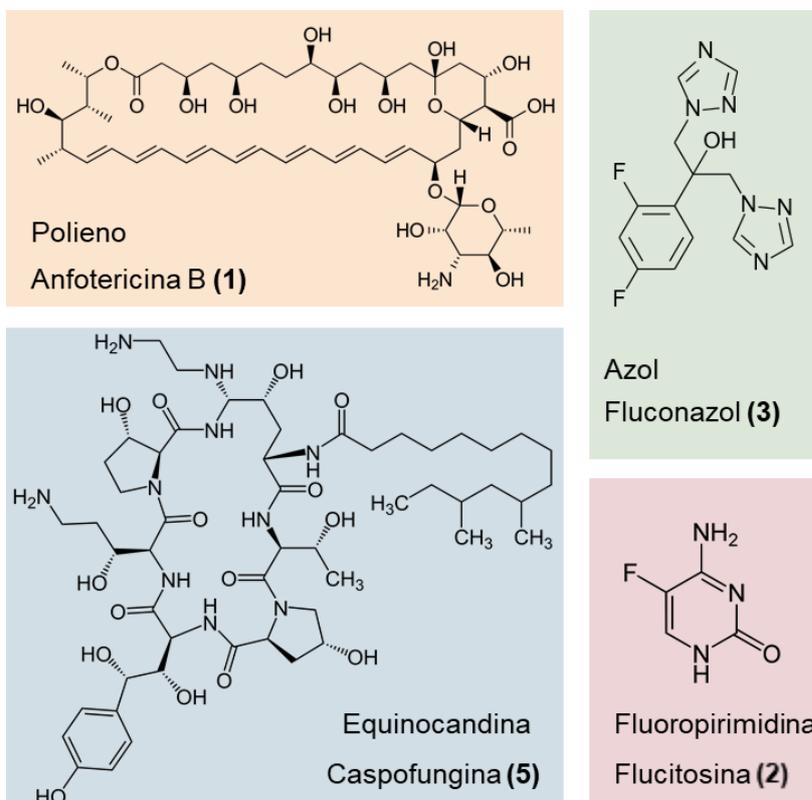
Atividade metabólica à 37 °C, estratégias para evitar, neutralizar ou escapar de respostas imunológicas, como melanina, formação de capsula de polissacarídeo, fatores de adesão e invasão, uso de células hospedeiras para inoculação, conhecidas como estratégia de cavalo de tróia são fatores de virulência de *C. neoformans* (BRUNKE, et al., 2016). Esta levedura possui mecanismos que permitem evasão e permanência em tecidos e órgãos por longos períodos, além de crescimento em diferentes formas morfológicas, como levedura, pseudohifa e hifa, que contribui para adesão e penetração em mucosas, tecidos e disseminação (ZARAGOZA, 2019).

S. brasiliensis apresenta dimorfismo térmico, capaz de passar por transição morfológica a 25 °C para levedura parasitária no tecido do hospedeiro em temperaturas de 35-37 °C (ROSSOW, et al., 2020). O potencial patogênico causado por fungos depende dos fatores de virulência, o que agrava as infecções e conseqüentemente o tratamento, os mecanismos de adaptação fúngica também contribuem para a ineficiência terapêutica (GIZIŃSKA, et al. 2019).

2.8 Terapêutica antifúngica

Durante décadas o tratamento das infecções fúngicas tem sido desafiador. Este fato é consequência da baixa disponibilidade de fármacos, da elevada toxicidade dos antifúngicos utilizados na clínica, dos tratamentos de longa duração e resistência aos agentes disponíveis (BOUZ e DOLEŽAL, 2021). O tratamento para infecções fúngicas é inespecífico e restrito a poucas classes de fármacos, dos quais se destacam representantes das classes de polienos, fluoropirimidinas, azóis e equinocandinas (Figura 5) (WATANABE et al., 2011; GARNAUD et al., 2016; WHALEY et al., 2017; IYER, et al. 2021). O arsenal para o tratamento antifúngico é limitado e necessita de otimização quanto à seletividade, toxicidade e resistência a longo prazo (THABISO et al., 2017).

Figura 5: Estrutura química dos principais agentes antifúngicos das classes polienos, azóis, equinocandinas e fluoropirimidina.



Os polienos foram a primeira classe de medicamentos antifúngicos introduzidos na clínica e incluem a anfotericina B (1) e a nistatina (6) que agem por meio da interação com o ergosterol, gerando poros que levam ao vazamento de componentes citosólicos e morte do fungo. A anfotericina B (1) apresenta boa atividade fungicida, no entanto seu uso é limitado devido à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (WHALEY et al., 2017; SEILER e OSTROSKY-ZEICHNER, 2021).

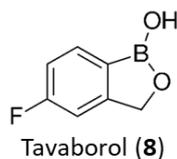
A classe dos azóis é a que mais apresenta agentes antifúngicos. Estes derivados atuam desestabilizando a membrana celular causando perturbações na síntese de ergosterol. Geralmente apresentam baixo custo, baixa toxicidade e são eficazes para o uso tópico e na profilaxia. O fluconazol (3) é o medicamento de primeira linha para o tratamento da maioria das doenças fúngicas. Já o itraconazol (4) é amplamente usado na terapia antifúngica de pacientes portadores do HIV. Os agentes azólicos possuem ampla margem de segurança, mas são associados a elevada taxa de resistência (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; WHALEY et al., 2017; SU, et al., 2018).

As equinocandinas são lipopeptídeos que atuam na parede celular do fungo, intervindo na biossíntese de 1,3,- β -d-glicana. A caspofungina (7) é bem tolerada para o tratamento de *Candida* spp., no entanto, seu uso bem como de outros medicamentos da classe, apresenta atividade fungicida concentração-dependente, o que levou ao aumento de isolados clínicos (IC) resistentes devido ao uso profilático (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; THABISO et al., 2017; OSTROSKY-ZEICHNER, 2021).

Os análogos fluoropirimidínicos como a flucitosina (2) – inicialmente desenvolvidos como agente antitumoral e então, reposicionados como antifúngicos – atuam principalmente contra fungos patogênicos filamentosos, porém suas eficácias são limitadas, dependentes da anfotericina B (1) como coadjuvante e apresentam altas toxicidades hepatológica e hematológica. (KATHIRAVAN et al., 2012; SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; OSTROSKY-ZEICHNER, 2021).

Após longo período de estagnação no desenvolvimento de antifúngicos, o composto tavaborol (8) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2014 (Figura 6), sendo o primeiro antifúngico inibidor de tRNA aprovado para uso clínico. Sua atividade ocorre por meio da inibição da síntese de RNA transferase impedindo a síntese de proteínas (BOUZ e DOLEŽAL, 2021).

Figura 6: Estrutura química do tavaborol (**8**).



Frente ao espectro limitado dos agentes antifúngicos, faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes ou formas farmacêuticas. Uma estratégia promissora é aumentar a eficácia dos medicamentos já existentes com abordagens da terapia combinada, composta por dois ou mais agentes em sinergismo para ampliar o espectro de atividade e redução do risco de adquirir resistência antifúngica (JAMES-ARMSTRONG et al., 2017; LI, et al., 2022).

2.9 O uso de sinergismo na terapia antifúngica

O desenvolvimento de novos antifúngicos não é tão simples. Além das características de cada espécie de fungo, estes possuem células eucarióticas como os humanos, o que demanda estudos de segurança farmacêutica face às elevadas doses para superar a resistência. Uma alternativa que tem sido explorada é o uso de tratamentos em sinergismo (SUN et al., 2018; GUCWA et al., 2018).

Sinergismo é o termo utilizado para descrever o aumento da potência de medicamentos quando utilizados em combinação com outras classes ou estratégias (CARVALHO et al., 2018). A ação dos antifúngicos, além de estar sujeitas aos mecanismos de resistência, muitas vezes são incompletas devido à incapacidade do fármaco em romper a camada da matriz extracelular do fungo (NAZARRO et al., 2017).

Estudos utilizando a terapia combinada entre produtos naturais com antifúngicos clássicos na clínica têm demonstrado potencial promissor para a diminuição da carga medicamentosa e maior efetividade. Em estudo realizado por Gucwa et al. (2018) o uso de própolis polonesa em sinergismo com fluconazol (**3**) foi capaz de diminuir em até 256 vezes a dose efetiva do derivado azólico.

Por sua vez, Hua-Yuan et al. (2016) demonstraram que a atividade combinada de chalconas sintéticas e fluconazol (**3**) para o tratamento de *C. albicans* potencializou a atividade antifúngica. Sardi et al. (2016) obtiveram uma série de compostos modificados a partir do ácido cafeico (**9**), cujo composto líder apresentou potenciais sinérgicos com a nistatina (**6**) – 8 a 32 vezes mais ativa – e com fluconazol (**3**) – 2 a 64 vezes – frente *C.albicans*. Considerando estudo *in vivo* utilizando o modelo de *Galleria mellonella* realizado por Sun et al. (2017), o uso de derivado glicocorticoide em sinergismo com fluconazol (**3**) aumentou significativamente a sobrevivência das larvas infectadas com *C.albicans*.

Outros estudos desenvolvidos por Cai et al. (2017) com *C. albicans* relataram que o uso da berberina (**10**) e análogos com fluconazol (**3**) apresentou sinergismo em baixas concentrações (CIM80 < 0,1 µg/mL); enquanto Zhang et al. (2019) observaram a diminuição do CIM80 de 512 µg/ mL para 0,25-1 µg/mL por meio do reposicionamento de agente antiviral em sinergismo com o fluconazol (**3**) para a mesma espécie.

Ainda considerando a estratégia de sinergismo, estudos revelaram que o uso de moduladores epigenéticos da classe dos inibidores de histonas desacetilases (HDAC) potencializaram a atividade antifúngica de azóis. Neste sentido, Pfaller et al. (2009) evidenciaram o aumento da atividade do fluconazol (**3**) para diversas espécies de fungos, entre elas 19 isolados de *Candida* spp., em sinergismo com o derivado MGCD290 (**11**), inibidor da desacetilase Hos2. Nesta mesma direção, considerando o sinergismo com fluconazol (**3**) para espécies de *Candida* ssp, Zhang e Xu (2015) revelaram a melhora do perfil antifúngico na presença de inibidores HDAC, cujos resultados foram corroborados pelos estudos de Paul-Satyaseela et al. (2017) que avaliaram derivados hidroxâmicos com resultados promissores de aumento da eficácia do agente azólico.

Morais e colaboradores (2020), utilizaram inibidores HDAC em sinergismo com a terapia fotodinâmica para avaliar o crescimento de *Cryptococcus* spp. e observou-se que a viabilidade celular foi prejudicada. Utilizando cepas de *Cryptococcus* resistentes ao fluconazol, foi testado a terapia fotodinâmica também com iHDAC e

constatou-se, por meio da deleção da HDAC, que as modulações epigenéticas aumentaram a susceptibilidade ao fluconazol, bem como, a inibição do crescimento por meio do sinergismo (RANJAN, et al., 2021).

A estratégia de combinação de agentes terapêuticos visando atuação sinérgica é uma abordagem proeminente, especialmente considerando o uso de moduladores epigenéticos no tratamento antifúngico. Neste contexto, o uso de inibidores HDAC interfere em vários mecanismos genéticos, como por exemplo resistência, regulação positiva das vias de resposta ao estresse, formação de biofilmes e outros fatores de virulências. Adicionalmente estão relacionados à melhoria da taxa de sobrevivência em infecções com elevado risco e diminuição da toxicidade pela redução das doses administradas (BRANDÃO et al., 2015; CHANG et al., 2019; CHAND, et al., 2021).

2.10 Mecanismos epigenéticos

Os fungos sofrem constantes mudanças em função do ambiente e precisam se adaptar rapidamente. Para tanto, fazem uso de várias habilidades para regular a expressão gênica e lidar com o estresse ambiental (VILLALOBOS-ESCOBEDO et al., 2016). Entre os meios de regulação estão os mecanismos epigenéticos que ocorrem durante seu ciclo de vida e envolvem a metilação do DNA e a ação das enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC) (WU e YU, 2015).

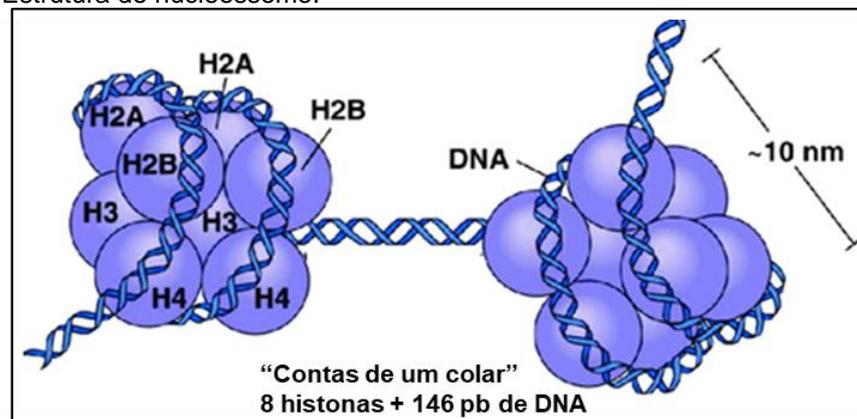
O termo epigenética, proposto por Conrad Hal Waddington (1940), está relacionado a modificações da cromatina envolvendo alterações reversíveis e hereditárias do genoma sem variação na sequência de nucleotídeos do DNA, como processo entre genótipo e fenótipo (SPEYBROECK, 2002; KHAN e KHAN, 2010; KELLERMAYER, 2012).

A cromatina possui estrutura e mecanismos altamente orquestrados para regular processos modelados pelo DNA e é composta por proteínas de histonas que tem como subunidade básica o nucleossomo. Esta ainda pode ser classificada em duas categorias: eucromatina e heterocromatina. A eucromatina possui estrutura com menor número de repetições de nucleossomos, o que confere estrutura menos densa e mais aberta, estando, desta forma, associada à transcrição gênica. Em

contraste, a heterocromatina é mais compacta apresentando maior densidade de nucleossomos e transcricionalmente é relacionada ao silenciamento de genes (MUSSELMAN, 2019).

O nucleossomo, unidade fundamental em que o DNA é empacotado, consiste em segmento de DNA em torno de núcleo octamérico composto pelas proteínas de histonas H2A, H2B, H3 e H4 envolvidos por bases de DNA. A subunidade *N*-terminal dessas proteínas consistem nas caudas de histonas que deixam o DNA com caráter positivo. Duas proteínas H3 e duas H4 originam tetrâmero combinado com dois dímeros H2A/H2B formando a histona. O nucleossomo se organiza dobrando-se em uma estrutura de ordem superior, como mostrado na Figura 7.

Figura 7: Estrutura do nucleossomo.



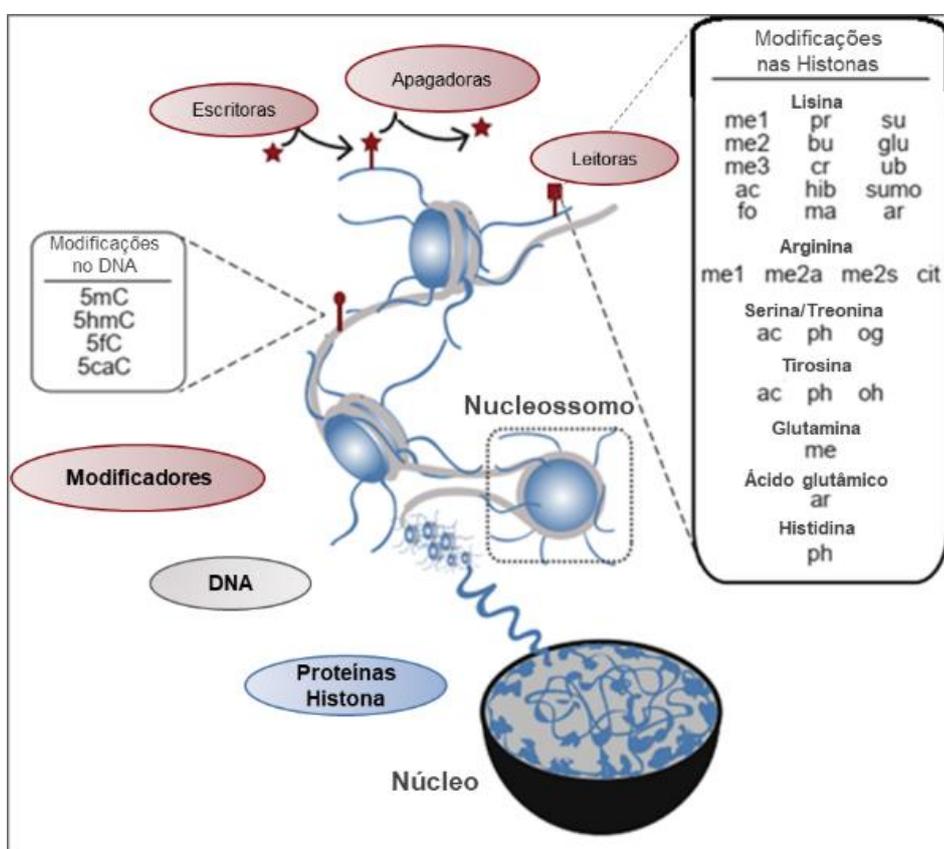
Legenda: O empacotamento do DNA envolve a associação com as histonas do núcleo e a formação do nucleossoma. H2A, H2B, H3 e H4 são histonas do núcleo que apresentam carga positiva. *Fonte:* adaptado de LU, et al., 2017.

Devido à dinâmica da cromatina durante os processos do DNA, após a tradução, as proteínas histonas podem ser modificadas. Tais modificações são denominadas como modificações pós-traducionais (MPT), e compreendem metilação, acetilação, ubiquitilação, fosforilação, entre outros eventos em aminoácidos específicos. As MPTs são marcas da cromatina denominadas como “escritoras”, “leitoras” e “apagadoras” (FYODOROV et. al., 2018).

As MPT das histonas que podem ser adicionadas ou removidas por enzimas chamadas “escritoras” ou “apagadoras”. Por exemplo, as HATs são proteínas “escritoras” que transferem o grupo acetila, enquanto as HDACs removem-no e são exemplos de “apagadoras”. Esses mecanismos permitem flexibilidade na dinâmica da

cromatina e na transmissão de sinalização e regulação gênica. As proteínas denominadas “leitoras”, possuem capacidade de interagir especificamente a certas modificações de histonas e afetam o processo nuclear definido como transcrição, reparo e replicação do DNA. As leitoras identificam as marcas deixadas pelas escritoras, as quais são removidas pelas apagadoras (NESTLER, 2016; BUSCAINO, 2019) Na Figura 8 é representada a estrutura básica da cromatina, bem como alguns processos das proteínas MPT.

Figura 8: Estrutura básica da cromatina

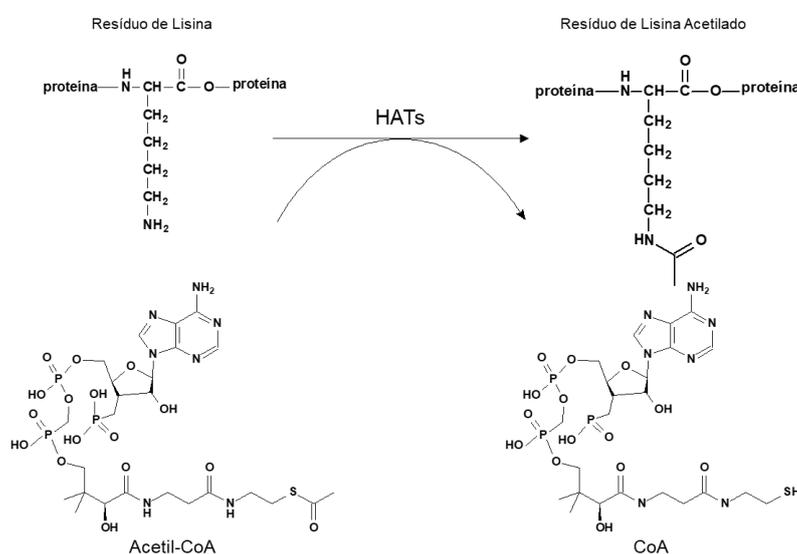


Legenda: Subunidade básica da cromatina, proteínas de histonas (azul) envolvidas por segmentos de DNA (cinza). Eurocromatina (parte menos densa no núcleo), heterocromatina (parte mais densa no núcleo). Caudas de histonas projetadas do núcleo de forma desestruturada. Em marrom as proteínas que podem modificar tanto as histonas, quanto o DNA (MPTs). As caixas descrevem modificações que incluem (1) para o DNA, 5-metilcitosina (5mA), 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC) e (2) para histonas, monometilação (me1), dimetilação (me2), trimetilação (me3), acetilação (ac), formilação (fo), propionilação (pr), butirilação (bu), crotonilação (cr), 2-hidroxilisobutirilação (hib), malonilação (ma), succinilação (su), glutarylation (glu), ubiquitylation (ub), sumoylation (sumo), ADP ribosilação (ar), dimetilação simétrica (me2s), dimetilação assimétrica (me2a), citrulinação (cit), fosforilação (ph) e O-GlcNAcilação (og) e hidroxilação (oh). *Fonte:* adaptado de MUSSELMAN, 2019.

2.10 Histonas acetiltransferases

A acetilação de histonas, descrita pela primeira vez em 1964, é regulada pela ação de duas classes de enzimas: HATs e HDACs. As HATs utilizam acetil-CoA como cofator e ou, substrato e agem como catalisadores na transferência do grupo acetila para o grupo amino das cadeias laterais da lisina (Figura 9). Com a mudança do grupo amino para o grupo amida há diminuição da carga positiva da lisina e enfraquecimento das interações entre as histonas e o DNA, deixando a conformação da cromatina mais aberta e suscetível a transcrição gênica (BANNISTER, 2011).

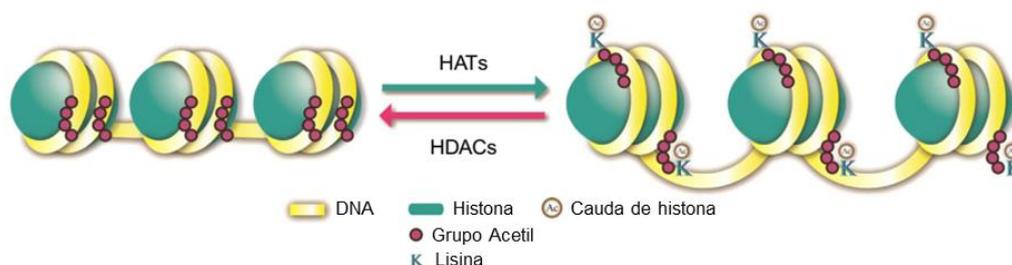
Figura 9: Mecanismo de transferência de grupo acetila pelas HATs.



Fonte: adaptado de RYE, et al., 2011.

A acetilação é conhecida como uma modificação pós-tradução que regula várias cascatas além dos domínios da cromatina como regulação transcricional e transdução de sinais. Trabalhos recentes têm sugerido a alteração da nomenclatura das HAT e HDAC para KAT (lisina acetiltransferase) e KDAC (lisina desacetilase), de forma mais apropriada à ação dessas enzimas no controle da homeostase dinâmica da acetilação de lisinas (LUAN. et al., 2015) (Figura 10).

Figura 10: Acetilação e desacetilação de lisinas catalisadas por HAT e HDAC.



Fonte: Adaptado de LUAN et al., 2015.

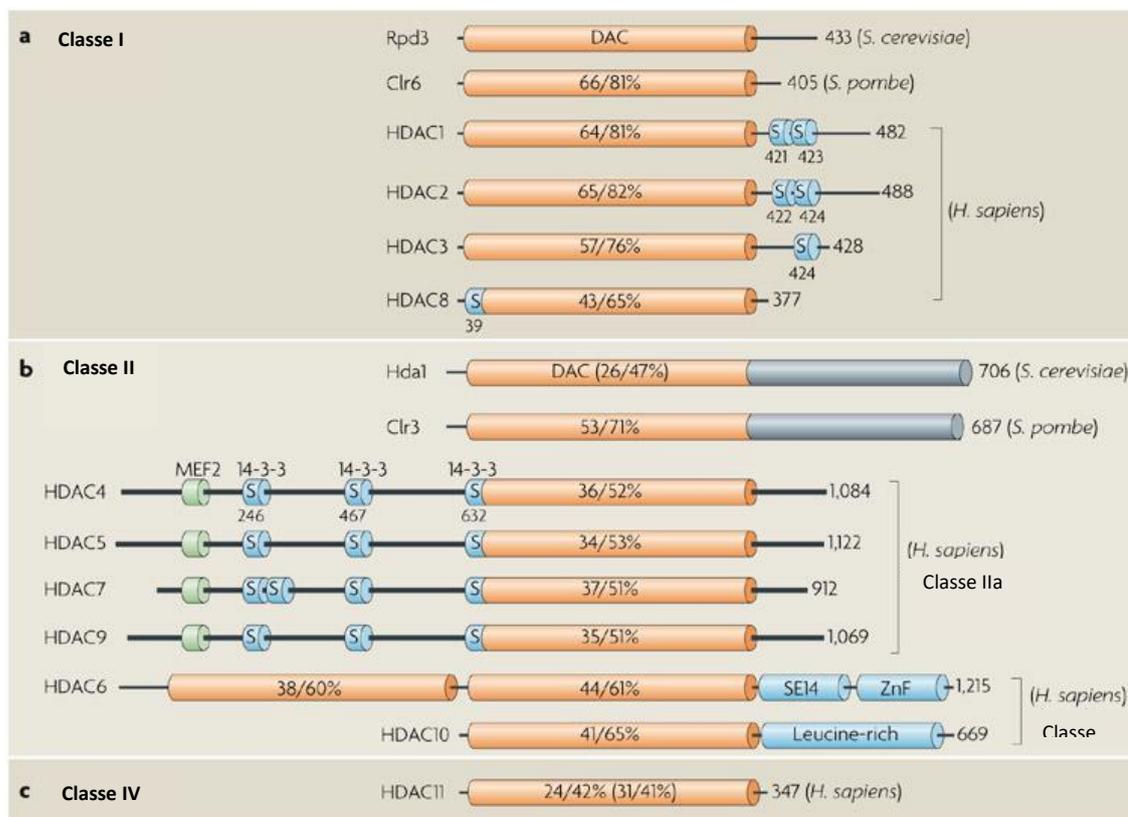
2.11 Histonas Desacetilases (HDACs)

As enzimas HDACs catalisam a desacetilação das cadeias laterais das caudas de lisinas das histonas, compactando a cromatina e, conseqüentemente, reprimindo a transcrição. As HDACs clássicas compartilham de sítio ativo dependente de zinco e compreendem as classes I, II e IV. Já a classe III, NAD⁺ dependente, é denominada de sirtuínas (LOMBARDI, et al., 2011).

Em humanos são descritos 18 tipos de enzimas HDACs, divididas em quatro classes: Classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8); Classe II, a qual é dividida em duas subclasses, IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) e IIb (HDAC6 e HDAC10); Classe III, composta pelas sirtuínas (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7); e a classe IV que apresenta a HDAC11 como único membro (LINCIANO et al., 2021).

A organização das classes está de acordo com as similaridades entre mamíferos e leveduras. Os domínios de similaridade entre as HDACs clássicas e as seqüências de aminoácidos presentes nas leveduras estão representados na Figura 11, bem como a porcentagem da homologia entre os domínios das isoformas HDACs nas faixas alaranjadas. As HDACs de classe I, II e IV foram numeradas de acordo com a ordem cronológica de seu descobrimento (SETO e YOSHIDA, 2014; CHOI et al., 2019).

Figura 11: Domínios de similaridade das histonas desacetilases.



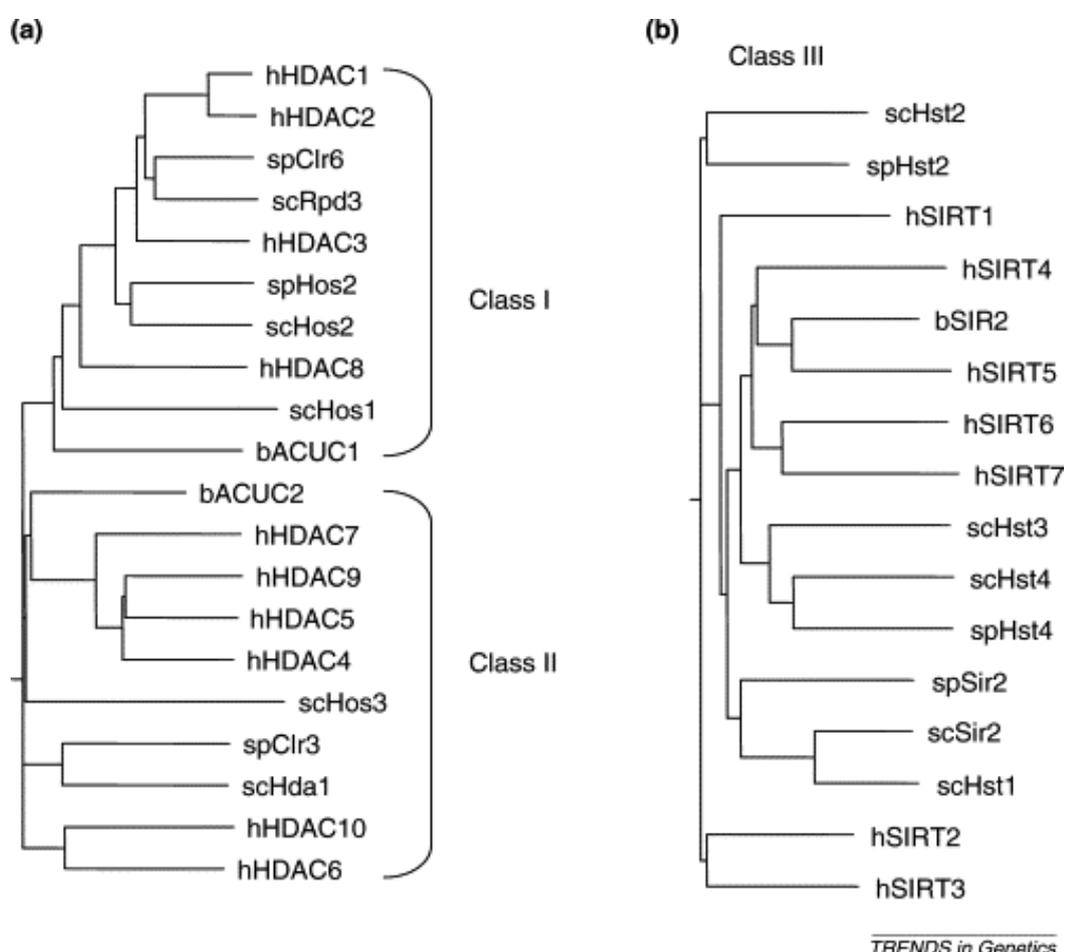
Legenda: O número total de resíduos de aminoácidos em cada desacetilase é mostrado à direita. Linhas pretas grossas representam domínios *N*-terminais semelhantes e caudas *C*-terminais de HDACs da classe IIa. Clr3, regulador de *locus* críptico-3; Hda1, histona desacetilase-1; *H. sapiens*, *Homo sapiens*; Rpd3, dependência reduzida de potássio-3; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; SE14, repetições de tetradecapeptídeo contendo Ser-Glu; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe*; ZnF, dedo de zinco. Fonte: adaptado de YANG e SETO, 2008.

As HDACs em fungos são altamente conservadas baseadas na ortologia de proteínas de leveduras. Neste sentido, foi identificado que as HDAC1, HDAC2 e HDAC3 desacetilam histonas reguladoras transcricionais (ZHANG, et al., 2021). Estudos demonstraram que a instabilidade do genoma de *C. albicans* é induzida por condições ambientais e que os fatores de patogenicidade de *C. neoformans* ocorrem devido à quantidade de componentes da heterocromatina codificados (BUSCAINO, 2019).

O agrupamento filogenético indica que as leveduras apresentam quantidade inferior de HDACs que os humanos. As HDACs de classe I são altamente homólogas ao Rpd3 de levedura, inteiramente conservado em comparação a outras classes. As

HDACs de classe II apresentam alta similaridade com a Hda1 da levedura e transitam entre o citoplasma e o núcleo celular. A HDAC11 (classe IV) é homóloga à Hos3 de levedura e compartilha domínio catalítico com HDACs classe I e II. Entre as HDACs de levedura, a classe I (Rpd3) e a classe II (Hda1) desempenham papéis importantes na repressão transcricional da expressão genética e estão associadas a locais específicos de promotores em leveduras (MILAZZO et al., 2020; PARK e KIM, 2020). A Figura 12 representa dendrograma da relação filogenética de leveduras e HDACs humanas (*hHDAC*) (EKWALL, 2005).

Figura 12: Dendrograma representando a relação filogenética de leveduras e HDACs humanos.



Legenda: **(a):** As subfamílias classes I e II do HDAC. **(b):** A família HDAC classe II. (As espécies são indicadas antes dos nomes das proteínas. H, *Homo sapiens*; sc, *Saccharomyces cerevisiae*; sp, *Schizosaccharomyces pombe*. Fonte: EKWALL, 2005.

As estruturas das histona desacetilases foram inicialmente descobertas devido a interações fortes de substâncias ao seu sítio ativo, o que deu início aos estudos dos inibidores HDAC (MOTTAMAL et al., 2012; SALVADOR et al., 2017).

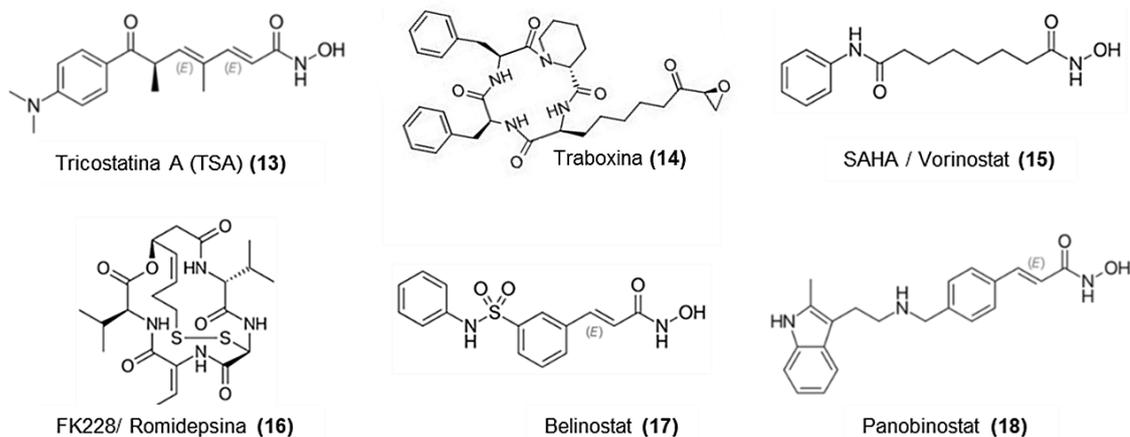
2.12 Inibidores das Histonas Desacetilases (HDACi)

Os inibidores das histonas desacetilases (HDACi) foram inicialmente avaliados para terapias anticâncer com número significativo de compostos em ensaios pré-clínicos (CHOI et al., 2019). Os HDACi são classificados de acordo com suas estruturas químicas como ácidos hidroxâmicos, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos e benzamidas (HRABETA et al., 2014; MANAL et al., 2016; PAUL-SATYASEELA et al., 2017).

Um dos primeiros HDACi, a tricostatina A (TSA) (**13**), foi isolado de *Streptomyces*, enquanto o tetrapeptídeo cíclico traboxina (**14**) foi obtido do metabolismo do fungo *Helioma ambiens*. Posteriormente, dois importantes inibidores, o ácido hidroxâmico SAHA (**15**) e a romidepsina FK228 (**16**) (Figura 13) foram relatados na literatura (CHOI et al., 2019; SETO e YOSHIDA, 2014).

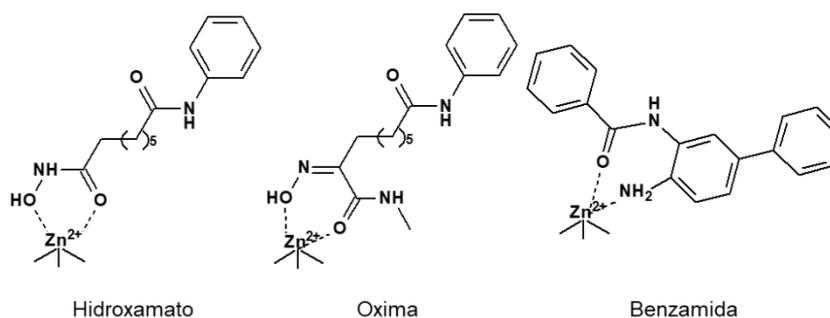
Os HDACi, obtidos de produtos naturais ou sintéticos, têm sido amplamente empregados no tratamento contra o câncer. Os derivados SAHA (**15**), romidepsina (**16**), berlinostat (**17**) e panobinostat (**18**) são exemplos de compostos utilizados no tratamentos de diferentes tipos de câncer (Figura 13) (YOSHIDA et al., 2017; CHOI et al., 2019).

Figura 13: Exemplos de inibidores HDAC.



Todos esses compostos apresentam similaridade estrutural que compreende o sítio de coordenação com Zn^{2+} capaz de formar quelatos com anéis de 4 até 7 membros (Figura 14), exceto a romidepsina (16) que é reduzida pelas células produzindo cadeia lateral com grupo tiol que coordena com o sítio ativo de zinco (LOMBARDI et al., 2011; VANDER et al., 2011; HSU et al., 2017; SHAKESPEAR et al., 2018)

Figura 14: Formação de quelatos com o sítio ativo de zinco.



Fonte: Lombardi, Patrick M et al., 2011.

De modo geral, o arcabouço estrutural dos inibidores HDACs apresenta a subunidade ZBG (grupo de ligação com zinco); o grupo espaçador (*linker*) hidrofóbico contendo de 6 a 14 átomos de carbono; e o grupo de reconhecimento de superfície (CAP). A Figura 15 mostra esquematicamente a estrutura dos HDACi (HSU et al., 2017; YOSHIDA et al., 2017).

Figura 15: Representação gráfica do arcabouço estrutural dos inibidores HDACs clássicos.

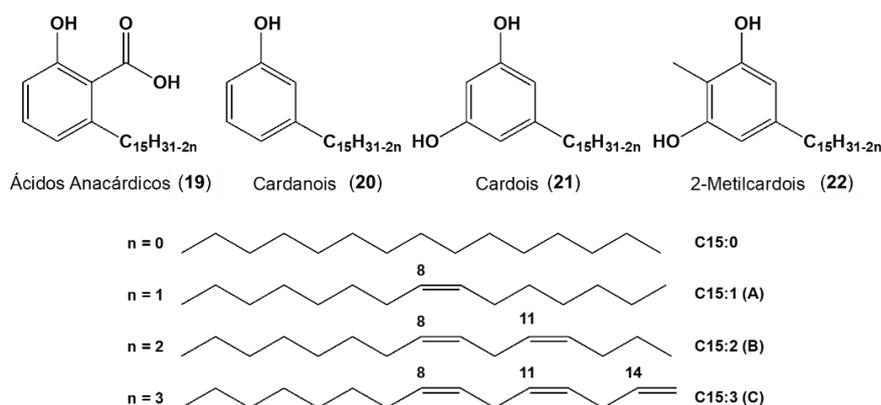


No âmbito da linha de pesquisa de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos sustentáveis e de baixo custo, dois dos atributos do estruturais dos HDACi – espaçador e CAP – são identificados no arcabouço molecular dos lipídeos fenólicos encontrados no líquido da casca da castanha do caju (LCC), o que nos motivou a envidar esforços para obtenção de agentes desta classe.

2.13 Derivados fenólicos do líquido da casca da castanha de caju (LCC)

O líquido da casca da castanha do caju (LCC) consiste em um óleo de coloração escura obtido da casca da castanha do caju – fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) nativo do Brasil. O LCC, uma das fontes mais ricas em misturas de lipídeos fenólicos não-isoprenoides e.g. ácidos anacárdicos (**19**), cardanois (**20**), cardois (**21**) e 2-metilcardois (**22**), compreende 25 % do peso do fruto, sendo uma matéria-prima barata e de fácil acesso a partir da castanha de caju *in natura* (LCC natural) ou como subproduto do beneficiamento industrial da castanha (LCC técnico) (MAZZETTO et al., 2009). Os compostos fenólicos do LCC apresentam núcleo aromático contendo cadeia lateral com 15 carbonos com variação no número de insaturações em posição *meta* às hidroxilas fenólicas (Figura 16).

Figura 16: Estruturas químicas da mistura de lipídeos fenólicos encontrados no LCC.



O LCC *in natura* ou natural, produzido no mesocarpo esponjoso da castanha do caju, é composto majoritariamente pela mistura de ácidos anacárdicos (**19**), seguida das misturas de cardois (**21**), cardanois (**20**) e 2-metilcardois (**22**). Estes mesmos constituintes quando obtidos durante o processo de beneficiamento da castanha geram o LCC técnico uma vez que são submetidos a temperaturas próximas a 200 °C levando à descarboxilação da mistura de ácidos anacárdicos (**19**) favorecendo a formação da mistura de cardanois (**20**) e de polímeros não identificados (MAZZETTO et al., 2009; XU et al., 2010; ULIASSI, et al., 2021).

As composições dos principais constituintes nos LCC natural e técnico está sumarizada na Tabela 1.

Tabela 1: Composições químicas dos LCC natural e técnico^a

Constituinte	LCC Natural	LCC Técnico
Ácidos Anacárdicos (19)	71,70-82,00 %	1,09-1,75 %
Cardanois (20)	1,60-9,20 %	67,82-94,60 %
Cardois (21)	13,80-20,10 %	3,80-18,86 %
2-Metilcardois (22)	1,65-3,90 %	1,20-4,10 %
Componentes Minoritários	2,20 %	3,05-3,98 %
Material Polimérico	----	0,34-21,63 %

^aReproduzido de Mazzetto, et al. (2009).

Os lipídeos fenólicos do LCC são considerados quimicamente versáteis para interconversões de grupos funcionais, explorando as reações de fenóis bem como das insaturações presentes nas cadeias alifáticas em C-8', C-11' e C-14, cuja composição percentual está descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Composição percentual relativa de insaturações nos constituintes fenólicos do LCC obtida por CG/MS^a

Constituinte	Ácidos Anacárdicos (19)	Cardanois (20)	Cardois (21)	2-Metilcardois (22)
Saturado	2,2-3,0 %	3,9 -4,4 %	0,2-2,7 %	0,9-1,3 %
Monoeno (8')	25,0-33,3 %	21,6-32,2 %	8,4-15,2 %	16,3-25,3 %
Dieno (8', 11')	17,8-32,1 %	15,4-18,2 %	24,2-28,9 %	20,6-24,4 %
Trieno (8', 11', 14')	36,3-50,4 %	45,1-59,0 %	36,5-67,2 %	49,8-62,2 %

^aReproduzido de Mazzetto et al. (2009).

O LCC, como subproduto da indústria do caju, é um resíduo não comestível de baixo custo e sustentável para o desenvolvimento de novos medicamentos explorando suas reatividades químicas a partir de procedimentos clássicos de síntese orgânica, ou suas propriedades estruturais como compostos puros e bioativos (LEMES et al., 2016; SILVA, et al., 2016; KIAMETIS et al., 2017; CARDOSO, 2017; CERONE, et al., 2019; ROMEIRO et al., 2019).

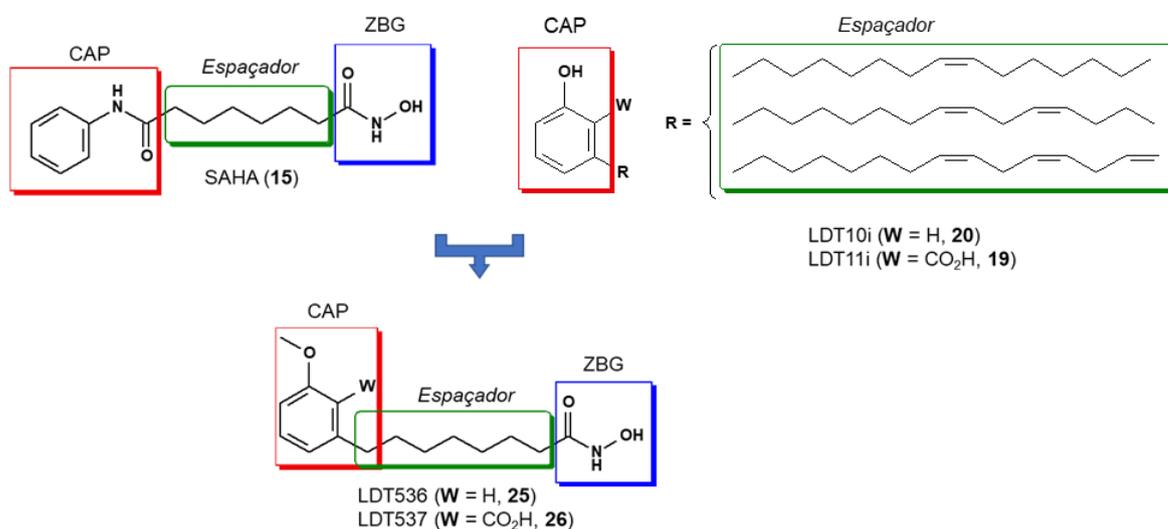
Neste contexto, os derivados do LCC têm sido empregados em diversos estudos. No âmbito da Química Medicinal, suas estruturas são privilegiadas por mimetizarem ácidos graxos naturais, podendo atuar como moléculas de sinalização que regulam efeitos fisiológicos no metabolismo e inflamação. Compostos puros, misturas ou modificados apresentam atividades para amplo espectro de doenças, tais como doenças metabólicas, neurodegenerativas, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DE ANDRADE, et al., 2021; ULIASSI, et al., 2021; ROSSE, et al., 2021; SAHIN, et al., 2022).

Estudos indicam que mecanismos epigenéticos, como acetilação e desacetilação de histonas, desempenham importantes papéis na patogênese de infecções fúngicas pela capacidade de alterar a virulência e resistência dos fungos a medicamentos (LI, et al., 2019). Logo, o desenvolvimento de novos inibidores HDAC planejados a partir dos lipídeos fenólicos do LCC vem ao encontro da necessidade de agentes antifúngicos capazes de reduzir os fatores de virulência, bem como inibir sua patogenicidade. Adicionalmente, o uso desta matéria-prima abundante, renovável e nativa do Brasil está alinhada aos princípios de bioeconomia bem como ao provimento de medicamento de baixo custo às populações mais carentes.

3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Os novos compostos foram planejados a partir da similaridade estrutural entre o SAHA (**15**) e os ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**). Os anéis aromáticos presentes nas misturas originais de ácidos anacárdicos (**19**) e cardanois (**20**) transformados nos derivados *O*-metilados representam a subunidade CAP – variação que visa o estabelecimento de relações estrutura-atividade (REA) – enquanto que o grupo ZBG é composto pelo ácido hidroxâmico gerado pela interconversão das subunidades carboxílicas nos ácidos **23** e **24**. O espaçador entre as subunidades CAP e ZBG, encontrado no SAHA (**15**), é composto por 8 unidades metilênicas, característica dos derivados do LCC após clivagem oxidativa, e representam o noranálogo **15** pela ausência de um átomo de carbono (Esquema 1). Os novos padrões moleculares visam a identificação de características estruturais relevantes para o perfil de atividade desta classe de compostos como uma nova alternativa terapêutica.

Esquema 1: Planejamento de novos HDACis a partir dos compostos fenólicos do LCC.



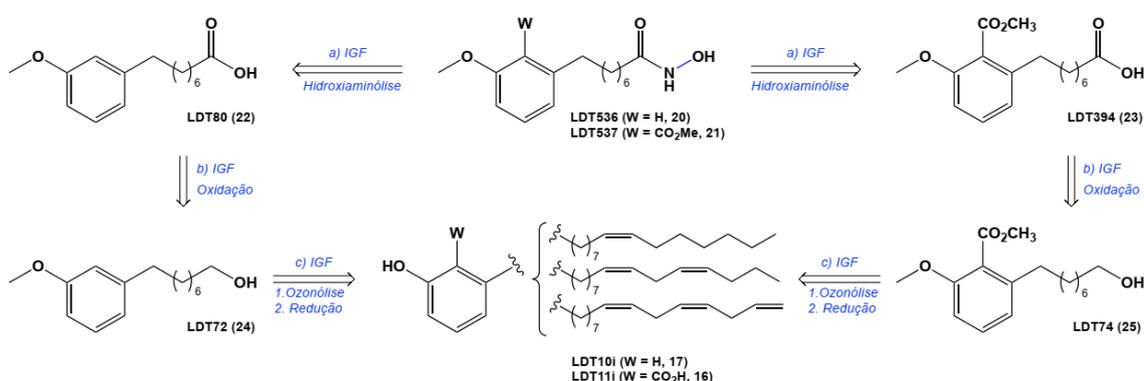
4. ESTRATÉGIA SINTÉTICA

4.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA

Nesta etapa foi proposta a síntese de dois novos compostos com características estruturais e eletrônicas semelhantes ao inibidor *pan*-HDAC vorinostat (SAHA, **15**) a partir da funcionalização dos principais componentes do LCC: matéria-prima nacional, renovável e de baixo custo.

Neste sentido, a síntese dos derivados-alvos foi baseada na análise retrossintética apresentada no Esquema 2.

Esquema 2: Análise retrossintética para obtenção dos compostos-alvos.



A análise retrossintética permitiu evidenciar que pela interconversão de grupos funcionais (IGF), etapa a, tem-se os ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**) como precursores dos hidroxamatos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) explorando as reações de condensação dos cloretos de ácidos ou hidroxiaminólise dos ésteres metílicos correspondentes.

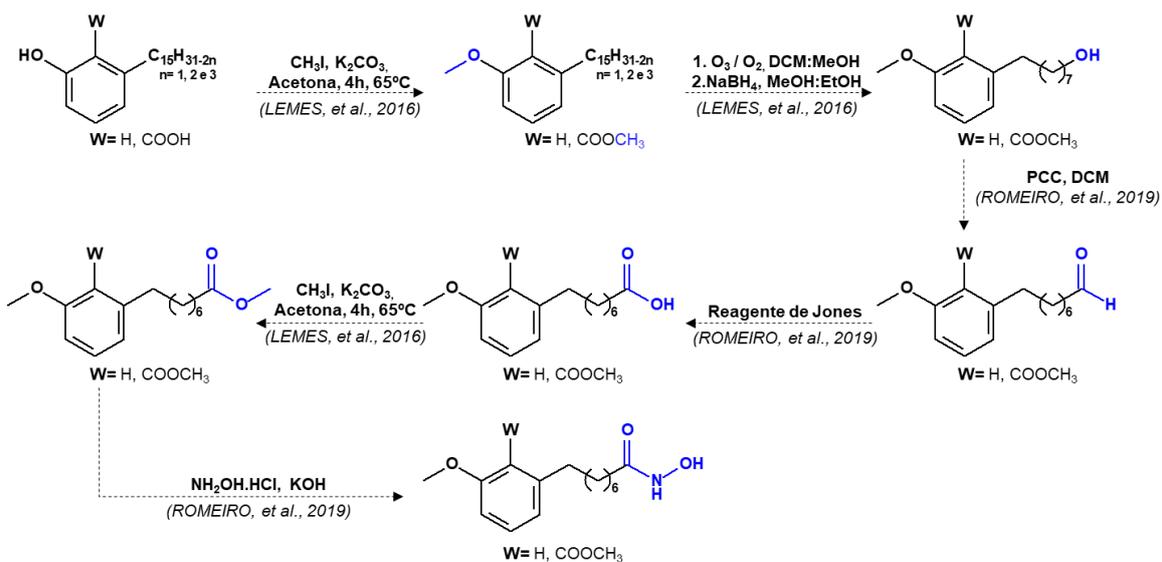
Por sua vez, os ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**), seguido de IGF, têm como precursores os álcoois LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**) após devida oxidação (etapa b) com reagente de Jones.

As misturas de cardanois LDT10i (**20**) e ácidos anacárdicos LDT11i (**19**) foram identificadas como precursoras imediatas dos álcoois LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**), seguidos de IGF, explorando a reatividade das duplas ligações frente a reação de clivagem oxidativa por ozonólise seguida de redução com borohidreto de sódio (etapa c).

4.2 PLANEJAMENTO SINTÉTICO

Os compostos hidroxâmicos, derivados dos lipídeos fenólicos presentes no LCC, foram planejados por meio da rota sintética apresentada no Esquema 3.

Esquema 3: Rota sintética empregada na obtenção dos compostos-alvos.



5. OBJETIVOS

5.1 GERAL

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o emprego dos lipídeos fenólicos do cajueiro (*Anacardium occidentale*) como matéria-prima, o presente estudo objetiva a síntese de inibidores histonas desacetilases (iHDAC) planejados a partir de lipídeos fenólicos do líquido da casca da castanha do caju e a avaliação antifúngica frente a espécies de *Candida*, *C. neoformans* e *S. brasiliensis*.

5.2 ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização de intermediários e compostos finais;
- Avaliação do perfil de atividade frente a histonas desacetilases;
- Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix brasiliensis*;
- Avaliação da atividade sinérgica dos compostos propostos com os antifúngicos fluconazol, voriconazol e itraconazol;
- Avaliação da atividade dos compostos na formação de biofilmes de *Candida* spp. e *S. brasiliensis*;
- Ensaios de toxicidade *in vitro* em células RAW 264.7;
- Ensaios de toxicidade *in vivo* no modelo *Galleria mellonella*.

Parte Experimental

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 *Hemissíntese orgânica aplicada aos derivados do LCC*

Os procedimentos experimentais de Síntese Orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade de Brasília no período de agosto de 2017 a setembro de 2020.

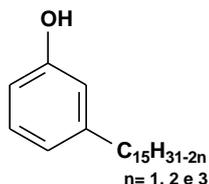
Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA) e Tedia® (EUA). O diclorometano (DCM), acetonitrila (MeCN) e trietilamina (TEA) foram previamente tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.

As reações – realizadas sob agitação magnética, radiação micro-ondas, à temperatura ambiente ou em aquecimento em banho de óleo – foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de sílica Kieselgel 60 F254 suportada em alumínio com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) reveladas em lâmpada de UV (254-365 nm), que permitiu o cálculo dos fatores de retenção (Rf). Quando necessário, os produtos foram revelados com solução hidroalcoólica de FeCl₃ a 5 % a fim de evidenciar a presença da hidroxila fenólica, ou solução alcoólica de 2,4-dinitrofenilhidrazina na identificação de aldeídos.

Para as reações sob radiação micro-ondas foi utilizado forno de micro-ondas doméstico Brastemp®, modelo BMJ38ARBNA Ative com capacidade de 38 L e potência de 1000 W.

As reações sob fluxo contínuo de ozônio foram realizadas em aparelho gerador de ozônio, modelo GO3500AA-INX (saída de O₃, até 3,5 g/h com ar seco, OzônioLine®). Para a purificação dos compostos foi utilizada cromatografia em coluna com fase fixa de gel de sílica G60 (70-230 mesh; 230-400 mesh, SILICYCLE®) bem como por meio do sistema de cromatografia flash em equipamento Isolera Spektra Systems with ACI™ (Biotage®) em cartucho de sílica SNAP 10 g. Os solventes foram

Hidróxipentadec-8-en-, 8,11-dien-,8,11,14-trieno LDT10i (20):



Óleo marrom

Rendimento: 72 %

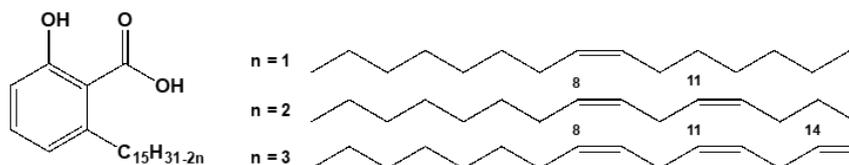
Rf: 0,63 (Hex 98 %:AcOEt 5 %)

Fórmula molecular: C₂₂H₃₂O

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz) δ: 0,89-0,95 (m, 3H, H15'a-b); 1,33-1,43 (m, 16H, H3'-6'a-c', H11'-14'a-b); 1,61 (sl, 2H, H2'a-c); 2,04-2,08 (m, 4H, 7'a-c, 10'a, 13b); 2,56 (t, J = 7,5 Hz; 2H, H1'a-c); 2,80-2,85 (m, 10'b-c, 13'c); 4,99-5,09 (m, 2H, H15'c); 5,37-5,46 (m, 3H, H8'-9'a-c, H11'-12'b-c); 5,79-5,87 (m, 14'c); 6,65-6,67 (m, 2H, H2, H6); 6,76 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H4); 7,15 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H5).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz) δ: 14,0-14,3 (CH₃, 15'a-b); 22,8-23,0 (CH₂, 14'a-b); 25,8-25,9 (CH₂, 10'b-c, 13'c); 27,4 (CH₂, 7'a-c, 10'a, 13'b); 29,2-29,9 (CH₂, 3'-6'a-c, 11'-12'a); 31,5 (CH₂, 2'a-c); 31,7-32,0 (CH₂, 13'a); 36,0 (CH₂, 1'a-c); 112,7 (CH, 6); 114,9 (CH, 15'c); 115,5 (CH, 2); 121,1 (CH, 4); 127,0-129,5 (CH, 8'-9'a-c, 11'-12'b-c); 129,6 (CH, 5); 130,0-130,6 (CH, 8'-9'a-c, 11'-12'b-c); 137,0 (CH, 14'c); 145,1 (C, 3); 155,7 (C, 1).

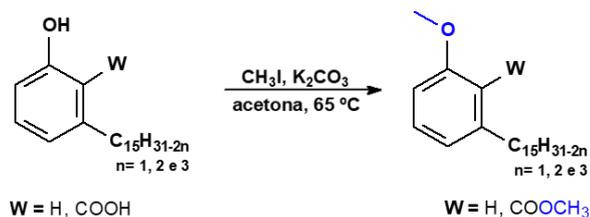
6.2.2 Obtenção da Mistura de Ácidos Anacárdicos a Partir do LCC Natural LDT11i (19):



O LCC natural foi obtido por meio da extração a quente dos lipídeos fenólicos da casca da castanha do caju com etanol 70 %. A amêndoa foi removida e as cascas cortadas em pequenos fragmentos, expondo o mesocarpo esponjoso contendo o LCC. A um sistema Soxhlet, acoplado a um balão de fundo redondo de 1.000 mL contendo etanol absoluto (500,0 mL), foram adicionados 500,0 g da casca da castanha de caju. O sistema permaneceu sob refluxo em manta de aquecimento por 24 horas. Após o término, o solvente foi evaporado à pressão reduzida fornecendo a

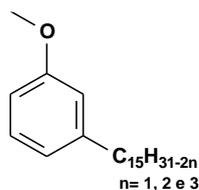
mistura de LCC natural. Em seguida, 30,0 g da mistura contendo os compostos fenólicos do LCC foram adicionados a um balão de 250 mL e diluídas com mistura metanol:água (6:1), seguido da adição de hidróxido de cálcio (15,0 g). O sistema reacional foi submetido a refluxo por 3 horas para formação do anacardato de cálcio que, ao término, o sal foi filtrado a vácuo em funil de Büchner. Em seguida o sólido foi transferido para Erlenmeyer de 250 mL, solubilizado em acetato de etila (150,0 mL) e, sob banho de gelo, acidificado até pH 1,0 com solução de ácido clorídrico a 50 %. A fase orgânica foi separada da fase aquosa, lavada com solução saturada de cloreto de sódio (30,0 mL) e seca em sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida, o resíduo foi purificado em coluna de gel de sílica eluída com gradiente de misturas de hexano e acetato de etila (5 % a 20 %), fornecendo a mistura de ácidos anacárdicos (LDT11i, **19**).

6.2.3 O-Metilação das Misturas de Cardanois LDT27i (**29**) e Ácidos Anacárdicos LDT28i (**30**)



A um balão de 150 mL foram adicionados 2,0 g das misturas LDT10i (**20**) ou LDT11i (**19**), acetona (50,0 mL) e carbonato de potássio [2 eqv. (LDT10i) ou 4 eqv. (LDT11)]. Após 40 minutos em agitação foram adicionados ao sistema reacional 2,5 equivalentes (LDT10i) ou 4,5 equivalentes (LDT11i) de iodeto de metila. A mistura reacional foi submetida a refluxo a 65 °C, com sistema de resfriamento acoplado a banho termostático à – 8 °C, por 8 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e o resíduo extraído com acetato de etila (3 x 15,0 mL), e as fases orgânicas reunidas lavadas com solução de ácido clorídrico a 10 % (15,0 mL), solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente à pressão reduzida, o resíduo foi purificado em coluna flash com gel de sílica (70-230 mesh), eluída com gradiente de mistura hexano e acetato de etila, fornecendo as misturas O-metiladas LDT27i (**29**) e LDT28i (**30**).

3-Metóxi-pentadec-8-en-, 8,11-dien, 8,11,14-trieno LDT27i (29)



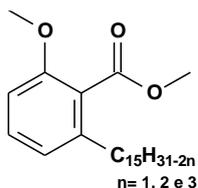
Óleo amarelo

Rendimento: 77 %

Rf: 0,32 (Hex 98 %:AcOEt 2 %)

Fórmula molecular: C₂₂H₃₂O

2-Metóxi-6-pentadec- 8-em-, 8,11-dien, 14-trieno fenilbenzoato de metila LDT28i (30):



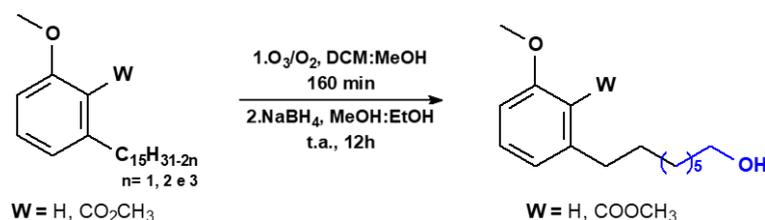
Óleo amarelo

Rendimento: 80 %

Rf: 0,36 (Hex 95 %: AcOEt 5 %)

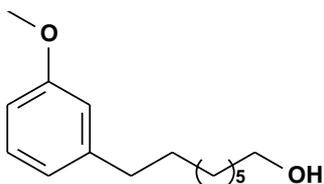
Fórmula molecular: C₂₄H₃₄O₃

6.2.4 Obtenção dos Derivados 8-(3-Metoxifenil)-1-octan-1-ol LDT72 (27) e 2-Metóxi-6-(8-hidróxiocetil)benzoato de metila LDT74 (28) :



A um balão de ozonólise de 150 mL foram adicionados 3,0 g da mistura de LDT27i (**29**) (9,39 mmol) ou LDT28i (**30**) (7,97 mmol), diclorometano (20,0 mL) e metanol (20,0 mL). Em seguida, sob banho de gelo, a solução foi submetida a fluxo de ozônio durante 4 ciclos de 40 minutos. Ao término do período, a solução foi purgada com ar, durante 10 minutos, para remoção do ozônio residual. Em seguida, a solução foi transferida para Erlenmeyer de 500 mL e, sob banho de gelo, foram adicionados metanol (15,0 mL), etanol (15,0 mL) e 1,3 g de boridreto de sódio (35,66 mmol, 4 eqv.). O sistema reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, a reação foi acidificada com solução de ácido clorídrico a 50 % até pH 3 e extraída com acetato de etila (3 x 20,0 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (15,0 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi purificado em coluna flash com gel de sílica (70-230 mesh) eluída com diclorometano ou clorofórmio.

8-(3-Metóxfenil)octan-1-ol LDT72 (**27**):



Óleo amarelo

Rendimento: 68 %

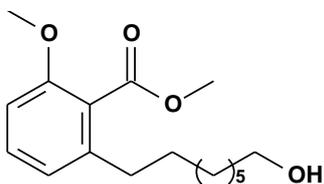
Rf: 0,44 (CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₂O₂

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,33 (sl, 8H, 3-6); 1,54-1,63 (m, 4H, 2 e 7); 2,59 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 8); 3,64 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, 1); 3,80 (s, 3H, OCH₃, 1'); 6,72-6,74 (m, 2H, 2' e 4'); 6,78 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 6'); 7,20 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 25,9 (CH₂, 6); 29,4 (CH₂, 3); 29,5 (CH₂, 5); 29,6 (CH₂, 4); 31,5 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 36,2 (CH₂, 8); 55,3 (OCH₃, 1); 63,2 (CH₂, 1); 111,0 (CH, 4'); 114,4 (CH, 5'); 121,0 (CH, 3'); 129,3 (CH, 2'); 144,7 (C, 6'); 159,7 (C, 1').

8-(1-Hidróxiocetil)-2-metóxi benzoato de metila LDT74 (**28**):



Óleo amarelo

Rendimento: 72 %

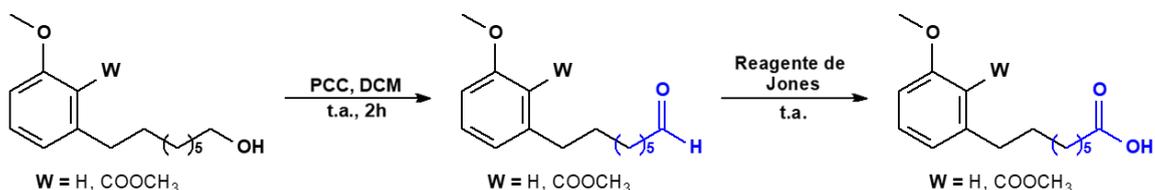
Rf: 0,33 (CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₇H₂₆O₄

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (sl, 8H, 3-6); 1,51-1,56 (m, 4H, 2 e 7); 2,53 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 8); 3,61 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, 1); 3,80 (s, 3H, OCH₃, 1'); 3,90 (s, 3H, CO₂CH₃); 6,75 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, 4'); 6,81 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, 6'); 7,25-7,28 (m, 1H, 5').

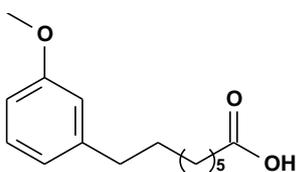
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 25,3 (CH₂, 6); 29,4 (CH₂, 3); 29,5 (CH₂, 5); 29,5 (CH₂, 4); 31,2 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 33,6 (CH₂, 1); 52,3 (OCH₃, 1); 56,2 (CH₃, CO₂CH₃); 63,1 (CH₂, 1); 108,5 (CH, 4'); 121,6 (CH, 5'); 123,6 (CH, 3'); 130,4 (CH, 2'); 141,45 (C, 6'); 156,4 (C, 1'); 169,2 (C, CO₂CH₃).

6.2.5. Obtenção dos Ácidos 8-(3-Metóxfenil) octanoico (LDT80, **23**) e 8-(2-Carbometóxi-3-metóxi) octanoico (LDT394, **24**):



A um balão de 50 mL foram adicionados 0,6 g do respectivo álcool seguido da adição de diclorometano seco (10,0 mL) e PCC (1,8 eqv.). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em coluna com gel de sílica (70-230 mesh) eluída com diclorometano. Após evaporação do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi solubilizado em acetona (10,0 mL) e, sob banho de gelo, foi adicionado, gota a gota, o reagente de Jones¹, até a observação do excesso de reagente pela presença de coloração marrom persistente. Após 5 minutos, foram adicionados álcool isopropílico (2,0 mL) para desativar o excesso de reagente até obtenção de solução verde. Em seguida, a reação foi transferida para funil de separação, extraída com clorofórmio (3 x 10,0 mL), e as fases orgânicas reunidas, lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL) e secas sob sulfato de sódio anidro. Os resíduos foram purificados em coluna flash de gel de sílica (70-230 mesh) eluída com gradiente de mistura clorofórmio e etanol (70 % a 30 %) fornecendo os derivados ácidos.

Ácido 8-(3-Metoxifenil)octanoico LDT80 (**23**)



Óleo amarelo

Rendimento: 83 %

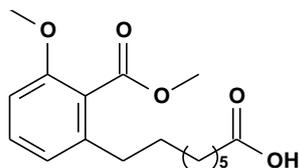
R_f: 0,55 (CHCl₃ 85 %:EtOH₁₅ %)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₂O₃

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,36 (6H, 4-b); 1,63-1,65 (m, 4H, 3 e 7); 2,36 (t, J= 7,4 Hz, 2H, 2); 2,60 (t, J= 7,7 Hz, 2H, 8); 3,81 (s, 3H, ArOCH₃); 6,73-6,75 (m, 2H, 2' e 4'); 6,79 (d, J= 7,7 Hz, 1H, 6'); 7,23 (t, J= 7,7 Hz, 1H, 5'); 9,99 (s, 1H, COOH, 1).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 24,8 (CH₂, 3); 29,2 (CH₂, 4); 29,3 (2CH₂, 5 e 6); 31,4 (CH₂, 7); 34,2 (CH₂, 2); 36,1 (CH₂, 8); 55,3 (ArOCH₃); 111,0 (CH, 4'); 114,4 (CH, 2'); 121,0 (CH, 6'); 129,3 (CH, 5'); 144,6 (C, 1'); 159,8 (C, 3'); 180,3 (CO₂H, 1).

8-(2-Carbometóxi-3-metoxi)octanoico LDT394 (**24**)



Óleo amarelo

Rendimento: 70 %

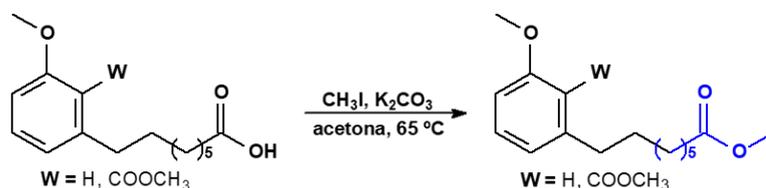
R_f: 0,46 (CHCl₃ 85 %: EtOH₁₅ %)

Fórmula molecular: C₁₇H₂₅O₅

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,32 (6H, 4-6); 1,57-1,62 (m, 4H, 3 e 7); 2,33 (t, J= 7,5 Hz, 2H, 2); 2,54 (t, J= 7,8 Hz, 2H, 8); 3,82 (s, 3H, ArOCH₃); 3,91 (s, 3H, ArCO₂CH₃); 6,76 (d, J= 8,3 Hz, 3'); 6,81 (d, J= 7,7 Hz, 5'); 7,27 (t, J= 7,8 Hz, 1H, 4').

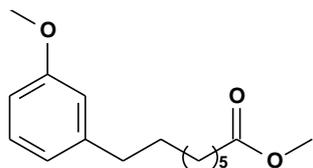
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 24,8 (CH₂, 3); 29,1 (CH₂, 4); 29,1 (CH₂, 5); 29,4 (CH₂, 5); 31,2 (CH₂, 7); 33,6 (CH₂, 2); 34,2 (CH₂, 8); 52,4 (ArCO₂CH₃); 56,1 (ArOCH₃); 108,6 (CH, 3'); 121,7 (CH, 5'); 123,6 (C, 1'); 130,5 (CH, 4'); 141,4 (C, 6'); 156,4 (C, 2'); 169,2 (ArCO₂CH₃); 180,3 (CO₂H, 1).

6.2.6 Obtenção do Ésteres 8-(3-Metoxifenil)octanoato de metila LDT483 (**31**),
8-(2-Carbometóxi-3-metóxi)octanoato de metila LDT395 (**32**):



A um balão de 50 mL foram adicionados 0,3 g do respectivo ácido, acetona (20,0 mL) e carbonato de potássio (2 eqv.). Em seguida, foi adicionado iodeto de metila (2 eqv.) e a mistura reacional submetida a refluxo (65 °C) durante 4 horas, com sistema de resfriamento acoplado a banho termostático a – 8 °C. Após esse tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo extraído com acetato de etila (3 x 10,0 mL), e as fases orgânicas reunidas lavadas com solução de ácido clorídrico a 10 % (10,0 mL), solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi purificado em coluna flash com gel de sílica (70-230 mesh), eluída com gradiente de mistura hexano e acetato de etila (20 % a 80 %), fornecendo os ésteres-derivados LDT483 (**31**) e LDT395 (**32**).

8-(3-Metóxfenil)octanoato de metila LDT483 (**31**):



Óleo incolor

Rendimento: 70 %

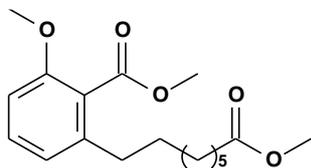
Rf: 0,51 (Hex 95 %: AcOEt 5 %)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₀O₃

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,34 (6H, 4-6); 1,62-1,65 (m, 4H, 3 e 7); 2,31 (t, *J*= 7,5 Hz, 2H, 2); 2,58 (t, *J*= 7,7 Hz, 2H, 8); 3,67(s, 3H, CO₂CH₃); 3,80 (s, 3H, ArOCH₃); 6,72-6,74 (m, 2H, 2' e 4'); 6,78 (d, *J*= 7,7 Hz, 1H, 6'); 7,19 (t, *J*= 7,7 Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 25,1 (CH₂, 3); 29,2 (CH₂, 4); 29,3 (2CH₂, 5 e 6); 31,4(CH₂, 7); 34,2 (CH₂, 2); 36,1 (CH₂, 8); 51,5 (ArCO₂CH₃); 55,3 (ArOCH₃); 111,0 (CH, 4'); 114,4 (CH, 2'); 121,0 (CH, 6'); 129,3 (CH, 5'); 144,6(C, 1'); 159,8 (C, 3'); 174,4 (CO₂CH₃,1).

8-(2-Carbometóxi-3-metoxi)octanoato de metila LDT395 (**32**):



Óleo amarelo

Rendimento: 65 %

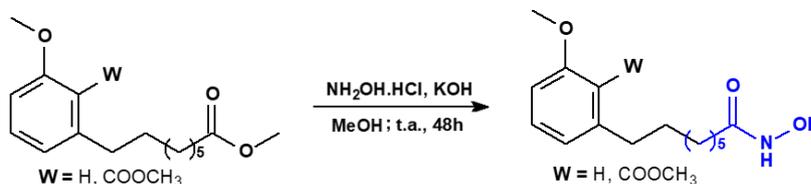
Rf: 0,70 (Hex 85 %:AcOEt 15 %)

Fórmula molecular: C₁₈H₂₆O₅

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (6H, 4-6); 1,55-1,63 (m, 4H, 3 e 7); 2,29 (t, *J*= 7,4 Hz, 2H, 2); 2,54 (t, *J*= 7,6 Hz, 2H, 8); 3,66 (s, 3H, CO₂CH₃, 1); 3,81 (s, 3H, ArOCH₃); 3,90 (s, 3H, ArCO₂CH₃); 6,76 (d, *J*= 8,3 Hz, 3'); 6,81 (d, *J*= 7,7 Hz, 5'); 7,27 (t, *J*= 8,0 Hz, 1H, 4').

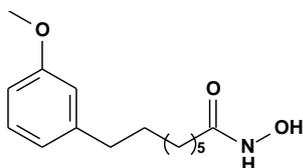
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 25,1(CH₂, 3); 29,2 (2CH₂, 4 e 5); 29,4 (CH₂, 6); 31,2 (CH₂, 7); 33,6 (CH₂, 2); 34,3 (CH₂, 8); 51,6 (CO₂CH₃, 1); 52,3 (ArCO₂CH₃); 56,1(ArOCH₃); 108,7(CH, 3'); 121,7 (CH, 5'); 123,8 (C, 1'); 130,4 (CH, 4'); 141,4 (C, 6'); 156,5 (C, 2'); 169,1 (ArCO₂CH₃); 174,4 (CO₂CH₃,1).

6.2.7 Obtenção dos derivados *N*-Hidróxi-8-(3-metoxifenil)octanamida LDT536 (**25**) e 8-(2-Carbometóxi)-*N*-hidróxi-8-(3-metoxifenil)octanamida LDT537 (**26**):



A um balão de 25 mL, sob banho de gelo, foram adicionados hidróxido de potássio (10 eqv.) e metanol (10,0 mL). Após diluição, foi adicionado cloridrato de hidroxilamina (10 eqv.). A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em funil comum com algodão para balão de 50 mL contendo, individualmente, os respectivos ésteres (**31** e **32**) solubilizados em metanol (5,0 mL). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 48 horas. Após este período, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo extraído com diclorometano (3 x 10,0 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL) e secas sob sulfato de sódio anidro. Os resíduos foram purificados por coluna flash com gel de sílica (70-230 mesh) eluída com gradientes de misturas de hexano e acetato de etila (50 % a 100 %) fornecendo os derivados correspondentes.

N-Hidróxi-8-(3-metoxifenil)octanamida LDT536 (**25**):



Óleo incolor

Rendimento: 36 %

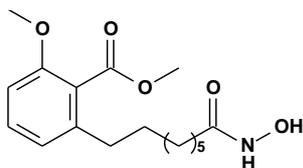
R_f: 0,46 (AcOEt)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₃NO₃

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,31 (s, 6H, 4-6); 1,60 (d, *J* = 6,3 Hz, 4H, 3 e 7); 2,10 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 2); 2,51-2,62 (m, 2H, 8); 3,79 (s, 3H, ArOCH₃); 6,69-6,79 (m, 3H, 2', 4' e 6'); 7,15-7,22 (m, 1H, 5').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 25,2 (CH₂, 3); 28,9 (CH₂, 4); 28,9 (CH₂, 5); 29,0 (CH₂, 6); 31,2 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 35,9 (CH₂, 8); 55,1 (ArOCH₃); 110,8 (CH, 4'); 114,3 (CH, 2'); 120,9 (CH, 6'); 129,2 (CH, 5'); 144,4 (C, 1'); 159,5 (C, 3'); 171,7 (CONHOH, 1).

8-(2-Carbometóxi)-N-hidróxi-8-(3-metóxfenil)octanamida LDT537 (26)



Óleo amarelo

Rendimento: 48 %

Rf: 0,57 (AcOEt)

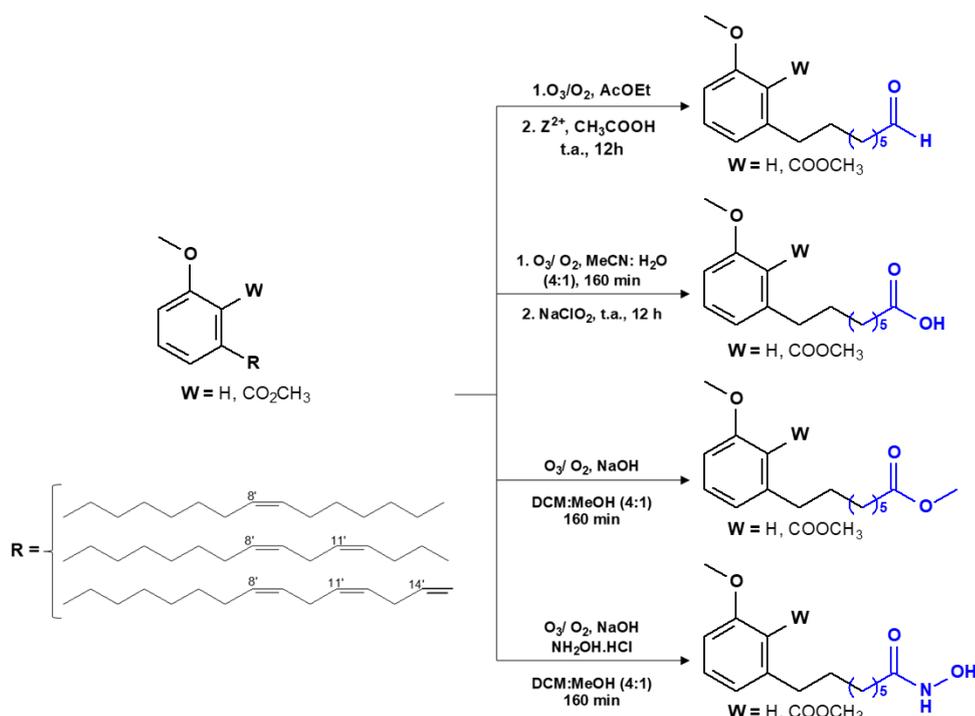
Fórmula molecular: C₁₅H₂₃NO₃

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,24-1,28 (m, 6H, 4-6); 1,53-1,55 (m, 4H, 3 e 7); 2,07 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 2); 2,50 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 8); 3,78 (s, 3H, ArOCH₃); 3,88 (s, 3H, ArCO₂CH₃); 6,73 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, 3'); 6,78 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5'); 7,24 (dd, *J* = 8,9, 7,2 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 25,1 (CH₂, 3); 28,7 (CH₂, 4); 28,8 (CH₂, 5); 28,9 (CH₂, 6); 30,7 (CH₂, 7); 32,7 (CH₂, 2); 33,2 (CH₂, 1); 52,2 (ArCO₂CH₃); 55,8 (ArOCH₃); 108,4 (CH, 3'); 121,4 (CH, 5'); 123,4 (C, 1'); 130,3 (CH, 4'); 141,1 (C, 6'); 156,2 (C, 2'); 169,2 (ArCO₂CH₃, C); 171,4 (CO₂CH₃, 1).

6.3. METODOLOGIA SINTÉTICA DO ESTUDO DE OZONÓLISE

6.3.1 *Obtenção dos intermediários aldeído 8-(3-Metóxi-6-fenila) -1-octanol (LDT393, 33), Ácido 8-(2-Carbometóxi-3-metóxi) octanoico (LDT394, 24), Éster 8-(2-Carbometóxi-3-metóxi) octanoato de metila (LDT395, 32) 8-(2-Carbometóxi)-N-hidróxi-8-(3-metoxifenil)octanamida (LDT537, 26):*



A um balão de ozonólise de 125 mL foram adicionados 0,6 g de LDT28i (**30**) (1,59 mmol) e acetato de etila (30,0 mL; método 1); ou acetonitrila (16,0 mL) e água destilada (4,0 mL; método 2); ou diclorometano (32,0 mL), metanol (8,0 mL) e hidróxido de sódio (7,96 mmol; método 3 e 4). Em seguida, sob banho de gelo, a solução foi submetida a fluxo de ozônio durante 4 ciclos de 40 minutos. Ao término desse período, o sistema reacional foi purgado com fluxo de ar para remoção do ozônio residual. Em seguida, a reação foi transferida para um balão de 50 mL e, sob banho de gelo, foram adicionados zinco metálico (4,5 eqv.) e ácido acético glacial (15,0 mL). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, o excesso de zinco metálico foi filtrado em funil comum com algodão e a fase orgânica extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com solução de bicarbonato de sódio a 10 % (15,0 mL), solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL), e secas em sulfato de sódio

anidro. Após remoção do solvente à pressão reduzida, o resíduo foi purificado em coluna flash de gel de sílica (70-230 mesh) eluída com gradientes de mistura de diclorometano e clorofórmio (50 % a 100 %), fornecendo o aldeído correspondente ao método 1. Para o método 2, a reação foi transferida para um balão de 50 mL e, sob banho de gelo, adicionado clorito de sódio (6,37 mmol) solubilizado em água destilada (4,0 mL). A reação ficou sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, foi adicionado bissulfito de sódio (3,50 mmol) solubilizado em água destilada (10,0 mL) e a reação permaneceu em agitação por mais 10 minutos. Em seguida, o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 10,0 mL), e as fases orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. O resíduo foi purificado em coluna flash com gel de sílica (70-230 mesh) eluída com gradiente de mistura clorofórmio e etanol (80 % a 20 %). Por fim, para os métodos 3 e 4, o sistema reacional foi purgado com fluxo de ar para remoção do ozônio residual e a mistura extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (10,0 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. O resíduo foi purificado em coluna flash com gel de sílica (70-230 mesh) eluída com gradiente de mistura clorofórmio e etanol (70 % a 30 %).

6.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

6.4.1 Avaliação do perfil de atividade inibitória em Histonas Desacetilases Humanas (hHDACs)

Os testes para determinação da atividade inibitória frente a HDACs humanas das classes I (1, 2, 3 e 8), II (4, 5, 6, 7, 9 e 10) e IV (11) foram realizados pela Reaction Biology Corporation (RBC). Os derivados-alvo foram previamente diluídos em DMSO na concentração de 10 mM e testados a 10 µM em duplicata contra as 11 HDACs. Para HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6 e HDAC10 foram utilizados o substrato peptídico fluorogênico dos resíduos 379 a 382 (RHKK(Ac)AMC) de células p53 e o mesmo resíduo diacetilado (RHK(Ac)K(Ac)AMC) para HDAC8. Para HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 e HDAC11 foi utilizada lisina trifluoroacetilada. A Tricostatina A (TSA)

foi utilizada como composto de referência em dose de 10 vezes, o CI_{50} calculado por meio do programa GraphPad Prism 4 com diluição seriada em três vezes começando em concentração de 10 μ M.

6.4.2 Avaliação da sensibilidade em espécies fúngicas

Os testes de sensibilidade da ação antifúngica foram realizados no Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes (LAPERRE) do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. Foi utilizado isolados clínicos (IC) e cepas fúngicas (Tabela 3) pertencentes à micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica. IC e cepas foram mantidas em ágar batata dextrose até o momento do uso as espécies de *S. Brasilienses* foram utilizadas na sua forma filamentosa.

Tabela 3: Cepas e espécies fúngicas usadas para o teste de sensibilidade.

Cepas	Espécies
ATCC 10231	<i>Candida albicans</i>
ATCC 750	<i>Candida tropicalis</i>
CEMM 02-6-079 ^(IC)	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC 90113	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CEMM 03-1-105 ^(IC)	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CEMM 05-3-050 ^(IC)	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
CEMM 05-3-075 ^(IC)	<i>Sporothrix brasiliensis</i>

Os testes de sensibilidade foram realizados na forma planctônica por meio da técnica de microdiluição em caldo conforme o protocolo M27-A3, para *S. brasiliensis*, os ensaios foram realizados na forma filamentosa seguindo os protocolos M38-A2 (CLSI, 2008a; 2008b). Para determinar a suscetibilidade das células planctônicas, os compostos alvos foram testados nas concentrações variando de 0,125 a 64 μ g/mL. Alíquotas de 100 μ L com meio RPMI-1640, tamponado em pH 7,0 com ácido 3-(*N*-morfolino)propanossulfônico (MOPS; Sigma®) e suplementados com os compostos LDT, foram distribuídas em diluições seriadas em placas de 96 poços. Como o

controle foram utilizados poços contendo o inóculo e o meio RPMI sem a adição dos compostos. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para *Candida* spp., 48 horas para *C. neoformans* ou 72 horas para *S. brasiliensis*. Todos os testes foram realizados em duplicata. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como aquela capaz de inibir o crescimento dos microorganismos em 50 %, 80 % e 100 % do crescimento fúngico visível quando comparado com o controle positivo (sem tratamento).

6.4.3 Avaliação do sinergismo entre azóis e hHDACi em células planctônicas

A avaliação da interação dos compostos alvos com antifúngicos azólicos – fluconazol (**3**), voriconazol (**12**) e itraconazol (**4**) – foi avaliada de acordo com Chatzimoschou et al. (2011), com adaptações. As concentrações para diluição dos compostos alvos e do SAHA (**15**) variaram de 0,125-128 µg/mL, adicionados juntamente com o fluconazol (**3**), voriconazol (**12**) e itraconazol (**4**), individualmente, em concentrações de 0,03-16 µg/mL. O inóculo foi preparado de acordo com o método do teste de sensibilidade e adicionado às placas de 96 poços contendo o composto LDT e o antifúngico. O antifúngico foi adicionado na coluna 1 e diluições seriadas de 2 vezes foram empregadas nas colunas 2-10. As placas foram incubadas a 35 °C no mesmo período determinado no teste de sensibilidade para cada espécie de fungo. Após o tempo de incubação, os valores de CIM obtidos foram utilizados para a determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e analisados pelo software Combenefit. As combinações com valores de ICIF \leq 0,5 foram consideradas sinérgicas; aquelas com valores menores que 0,5 ou \leq 0,4 foram avaliadas como indiferentes; e os derivados que apresentaram ICIF $>$ 4 foram classificados como antagônicos (ODDS, 2003). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas.

6.4.4 Avaliação dos compostos sobre a formação do biofilme fúngico

Os biofilmes de *Candida* spp., de *S. brasiliensis* e de *C. neoformans* foram formados de acordo com os protocolos de Brilhante et al. (2016) e Brilhante et al (2018) respectivamente. Para *Candida* spp. e *C. neoformans* os compostos, individualmente, foram adicionados junto com o inóculo fúngico em placas de 96 poços de fundo chato. Para *S. brasiliensis* o inóculo foi adicionado aos poços após 24 horas de adesão. Em seguida, os poços foram lavados e os compostos LDT536 **(25)** e **(26)** foram adicionados. Foram utilizados poços contendo apenas o biofilme como controle de crescimento. As placas foram incubadas por 24 horas para *Candida* ou 72 horas para *C. neoformans* e *S. brasiliensis*. Após o período de incubação de cada biofilme, os poços foram lavados e a atividade metabólica e biomassa do biofilme foram quantificadas utilizando o ensaio de redução do sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT, Sigma®) e coloração do cristal violeta. Para avaliar o efeito da caspofungina, a ocorrência de efeito paradoxal foi considerada presente quando observado aumento na atividade metabólica igual ou maior a 20 % comparado ao controle de crescimento do biofilme, em concentrações acima do CIM₉₀. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Os biofilmes de *C. albicans* (ATCC 10231) formados na presença do composto LDT537 **(26)** foram analisados por MEV seguindo protocolo descrito por Brilhante et al. (2016). Os biofilmes foram preparados diretamente na superfície de lamínulas Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando uma placa de cultura de 12 poços. Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas Thermanox™ contendo os biofilmes foram lavadas com tampão cacodilato 0,15 M com azul de alcian (0,1%) duas vezes. Os biofilmes foram, então, recobertos com glutaraldeído (2,5% em tampão cacodilato 0,15 M) e incubados *overnight* a 4 °C. Posteriormente, os biofilmes foram lavados com o tampão cacodilato, por 5 minutos cada lavagem, e as lamínulas foram submetidas à desidratação por lavagens seriadas com álcool em concentrações ascendentes (50 %, 70 %, 80 %, 95 % e 100 %), duas vezes por 10 minutos para cada concentração. As lamínulas foram secas à temperatura ambiente e, então, recobertas

com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos. Em seguida, o hexametildisilazano foi removido e as lamínulas secas em dessecador por 24 horas. As lamínulas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q15T) e observadas em Microscópio Eletrônico FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV. As imagens foram processadas com Photoshop (Adobe Systems, USA).

6.4.6. Avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos foi utilizado o ensaio de redução do MTT brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, o qual é convertido em formazan por células metabolicamente ativas, possibilitando a quantificação da percentagem de células vivas (MOSMANN, 1983). As células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 96 poços e mantidas por 18 horas. As células foram tratadas com o LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) nas concentrações de 0,39-200 μ M. Após 24 horas, o MTT foi adicionado para uma concentração final de 1 mg/mL no poço. Após 3 horas, o meio foi retirado e 150 μ L de DMSO foram adicionados para posterior leitura da absorbância a 570 nm (Biochrom® Asys UVM340). Para o grupo controle foi adicionado meio de cultura com veículo (DMSO 1 %), enquanto no controle positivo foi adicionado apenas o meio de cultura sem o veículo. A viabilidade celular foi calculada como percentagem de células viáveis nos grupos tratados versus do grupo controle não-tratado.

6.4.7 Avaliação da toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella*

Os compostos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) juntamente com o SAHA (**15**), foram avaliados *in vivo* usando o modelo animal *G. mellonella*. As larvas foram crescidas em dieta de pólen e cera de abelha em uma estufa a 30 °C no escuro. Para a avaliação da toxicidade, larvas do sexto instares de *G. mellonella*, com massas entre 200 mg e 250 mg, foram randomizadas em grupos mínimos de 16 indivíduos para cada grupo experimental. Após assepsia da cutícula das larvas com etanol 70 %, as lavas foram inoculadas na sua última falsa pata esquerda com 10 μ L de soluções de 600 μ g/mL

(equivalente a uma dose de 20 mg/Kg) de cada um dos três compostos em PBS contendo 10 % de DMSO, utilizando-se uma seringa Hamilton de 50 μ L. Grupos controles incluíram um grupo de larvas inoculadas apenas com BPS. Um grupo de larvas inoculada com PBS contendo 10 % de DMSO, e um grupo de larvas que não foram inoculadas. Após a inoculação as larvas foram incubadas a 37 °C e acompanhadas diariamente para avaliação da sua sobrevivência durante 10 dia. Esse experimento foi repetido 2 vezes, em dias diferentes.

6.4.8 Análise estatística

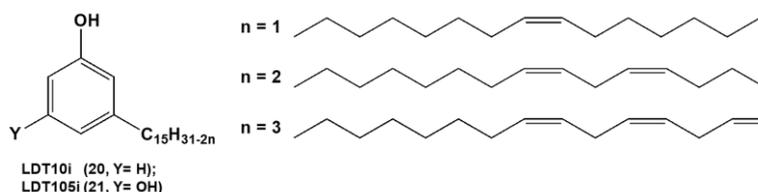
Para a análise do biofilme, os dados resultantes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação múltipla de Tukey. Para os ensaios de citotoxicidade, os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (DP) de três determinações. Os dados resultantes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, EUA).

Resultados e Discussão

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 METODOLOGIA SINTÉTICA

7.1.1 Obtenção da mistura de cardanois (**20**) e cardois (**21**)



A síntese do composto hidroxâmico LDT536 (**25**) foi iniciada pela purificação da mistura de cardanois LDT10i (**20**) a partir do LCC técnico destilado fornecido pela empresa RESIBRAS[®]. Este LCC técnico apresenta, além da mistura **20** como produto majoritário, mistura de cardois – LDT105i (**21**) – bem como polímeros resultantes da oxidação da cadeia lateral e grupos fenólicos. Neste sentido, a purificação realizada em coluna contendo gel de sílica eluída com hexano forneceu a mistura LDT10i (**20**) em rendimento de 72 % em relação à massa aplicada. Por sua vez, o aumento da polaridade do eluente hexano:acetato de etila (9:1) forneceu a mistura LDT105i (**35**) em rendimento de 3 %.

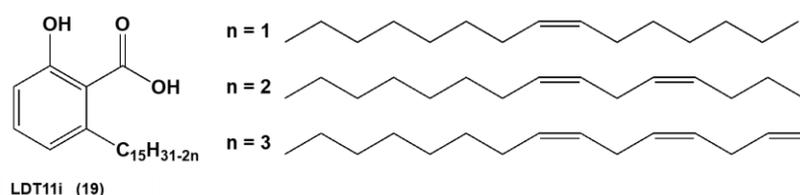
A análise dos espectros de RMN para a mistura LDT10i (**20**) revelou a presença dos derivados monoeno (a, C8'-C9'), dieno (b, C8'-C9' e C11'-C12') e trieno (c, C8'-C9', C11'-C12' e C14'-C15'). Os hidrogênios alílicos 7'a-c, 10'a e 13b foram assinalados como multiplete na faixa entre 2,04 ppm e 2,08 ppm em RMN de ¹H, corroborados pelos sinais em 27,4 ppm em RMN de ¹³C. Os hidrogênios bis-alílicos 10'b-c e 13'c foram identificados como multiplete na faixa de 2,80 ppm a 2,85 ppm, confirmados no espectro de RMN de ¹³C pelos sinais na faixa de 25,8 ppm a 25,9 ppm. Os metilidenos 8'-9'a-c e 11'-12'b-c foram observados como multiplete na faixa de 5,37 ppm a 5,46 ppm no espectro de RMN de ¹H e confirmados no espectro de carbono 13 nas faixas de 127,0 ppm a 129,5 ppm e 130,0 ppm a 130,6 ppm. Por sua vez, o grupo metilideno 14'c foi identificado como multiplete na faixa de 5,79 ppm a 5,87 ppm RMN de ¹H e confirmado pelo sinal em 137,0 ppm em RMN de ¹³C. Por fim,

o grupo metileno terminal 15'c foi assinalado como multiplete entre 4,99 ppm e 5,09 ppm no espectro de RMN de ^1H corroborado em 114,9 ppm em RMN de ^{13}C .

Considerando os átomos de carbono saturados, os grupos metila (15'a-b) foram identificados como multiplete na faixa de 0,89 ppm a 0,94 ppm em RMN de ^1H bem como sinais na faixa de 14,0 ppm a 14,3 ppm em RMN de ^{13}C . Os grupos metileno 3'-6'a-c, 11'-14'a e 14'b foram assinalados como sinal largo na faixa entre 1,33 ppm e 1,43 ppm em RMN de ^1H ; pelos sinais entre 29,2 ppm e 30,0 ppm para 3'-6'a-c e 11'-12'a; 31,7 ppm e 32,0 ppm para 13a; e 22,7 ppm a 23,0 ppm para 14'a-b em RMN de ^{13}C . Finalmente, o tripleto em 2,58 ppm e o sinal largo em 1,60 ppm em RMN de ^1H foram associados aos respectivos metilenos 1'-2'a-c e corroborados pelos assinalamentos em 31,5 ppm e 36,0 ppm em RMN de ^{13}C .

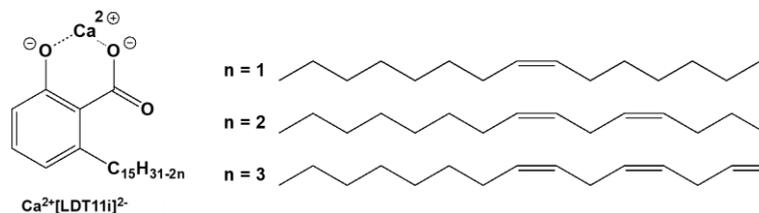
Os grupos metilideno aromáticos 2, 4 e 5a-c foram identificados pelos assinalamentos entre 6,78 ppm e 7,76 ppm em RMN de ^1H e confirmados pelos sinais entre 112,7 ppm a 129,6 ppm em RMN de ^{13}C , enquanto os carbonos quaternários foram observados em 145,1 ppm para 3a-c e 155,7 ppm para 1a-c no mesmo espectro (Anexo 01, pág. 141).

7.1.2 Obtenção da mistura de ácidos anacárdicos (**19**)



A mistura de ácidos anacárdicos (**19**) foi obtida como óleo castanho a partir do LCC natural, via complexação com hidróxido de cálcio, em rendimento de 70 % em relação à massa aplicada. Embora não submetida à análise por métodos espectroscópicos, a mistura foi caracterizada por cromatografia de camada delgada (CCD) apresentando única mancha de coloração violeta com R_f 0,4 (Hex₈₅ %: AcOEt₁₅ %). O método mostrou-se eficiente devido à habilidade da subunidade salicílica – exclusiva dos ácidos anacárdicos dentre os compostos do LCC – complexar com íons metálicos divalentes levando ao sal anacardato de cálcio (**36**), que é insolúvel na solução metanol/ água (Figura **18**).

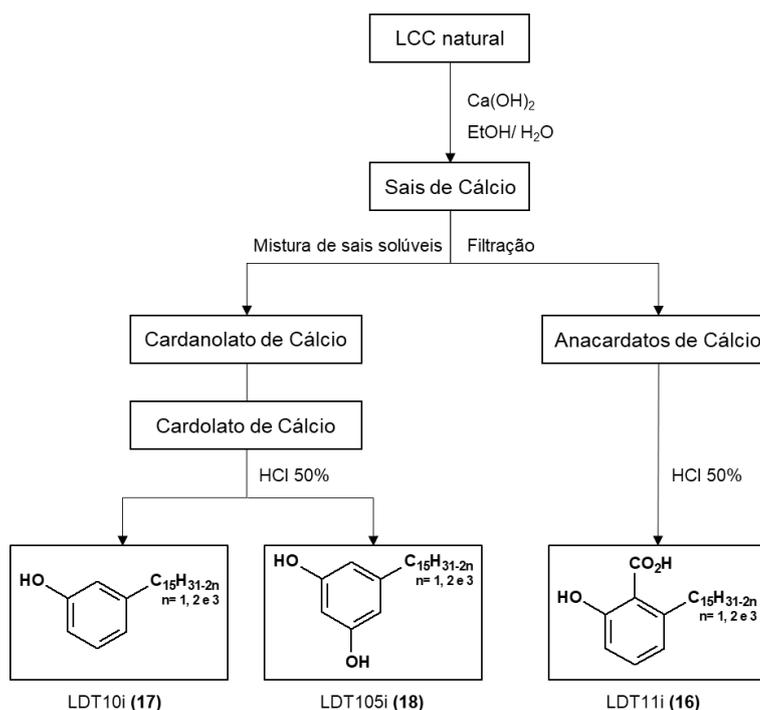
Figura 18: Anacardato de cálcio ($\text{Ca}^{2+} [\text{LDT11i}]^{2-}$) (**36**).



Após acidificação do meio com solução de HCl a 50 %, houve a liberação do íon cálcio levando à mistura de ácidos anacárdicos (**19**), que foi purificada em coluna contendo gel de sílica eluída com gradiente de misturas de hexano e acetado de etila.

A representação esquemática da separação dos principais componentes do LCC natural está ilustrada na Figura 19.

Figura 19: Separação dos principais componentes do LCC natural.



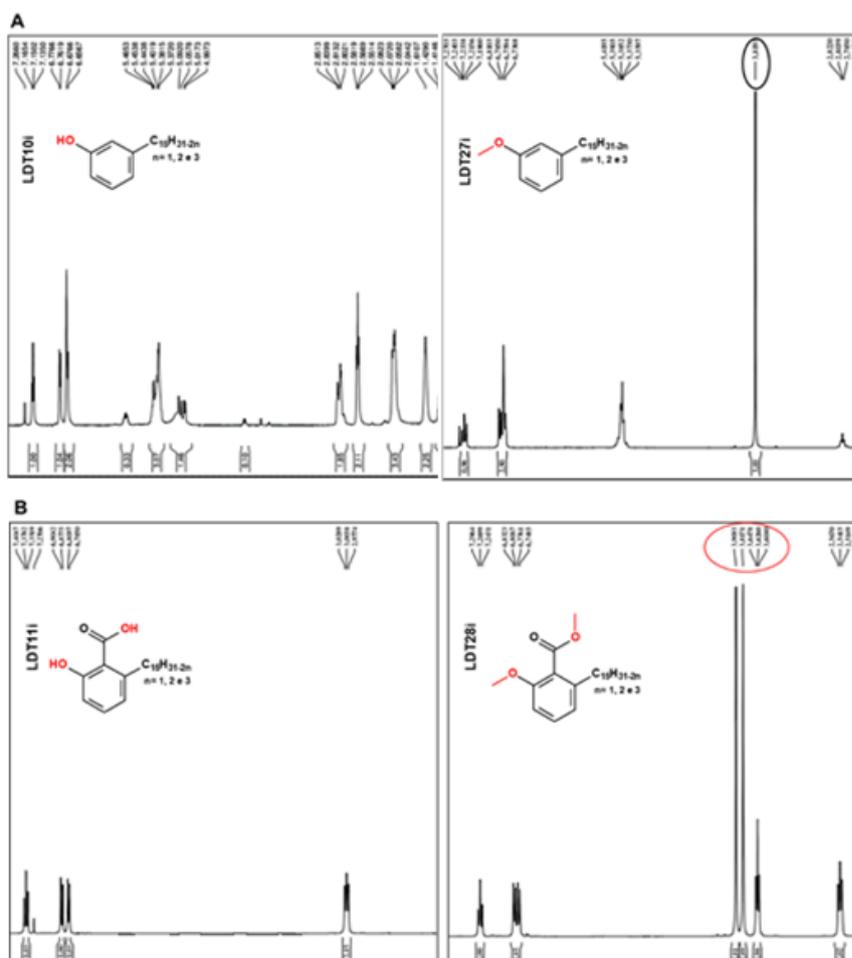
7.1.3 Obtenção das misturas O-metiladas LDT27i (**29**) e LDT28i (**30**)

De posse das misturas LD11i (**19**) e LD10i (**20**), estas foram submetidas à reação de O-metilação dos grupos fenólicos, bem como do ácido carboxílico para LDT11i (**19**), levando às misturas de cardanois monometilados (LDT27i, **29**) e de ácidos anacárdicos dimetilados (LDT28i, **30**). A metilação dos fenóis foi evidenciada pela ausência de coloração padrão em CCD quando da revelação com solução de

cloreto férrico a 5 %. A combinação de fenóis com cloreto férrico em meio alcoólico leva à coordenação dos íons Fe^{3+} com as hidroxilas fenólicas fornecendo a coloração marrom devido à transição eletrônica. A coloração é um indicativo da presença do fenol (DE PEREIRA, et al., 2021).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C revelaram a presença das metoxilas fenólicas para as misturas LDT27i (**29**) e LDT28i (**30**) como singletos em 3,82 ppm no espectro de RMN de ^1H (Figura 20) corroborado pelo deslocamento químico em torno de 55,0 ppm no espectro de RMN de ^{13}C . Por sua vez, o grupo metoxila da subunidade carbometóxi da mistura de ésteres foi identificada pela presença dos sinais em 3,91 ppm e 52,9 ppm nos respectivos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

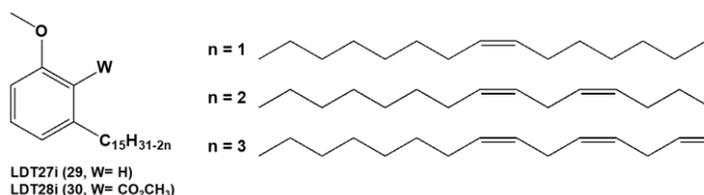
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H comparando a presença de assinalamento das metoxilas **29** e **30** em relação aos seus precursores.



Legenda: **A.** Assinalamento no espectro de RMN de ^1H referente à reação de O-metilação das misturas LDT10i (**17**) e LDT27i (**27**) **B.** Assinalamento no espectro de RMN de ^1H referente à reação de O-metilação das misturas LDT11i (**16**) e LDT28i (**28**).

Os rendimentos e características físico-químicas e espectroscópicas de RMN das misturas LDT27i (**29**) e LDT28i (**30**) estão ilustrados na Tabela 4.

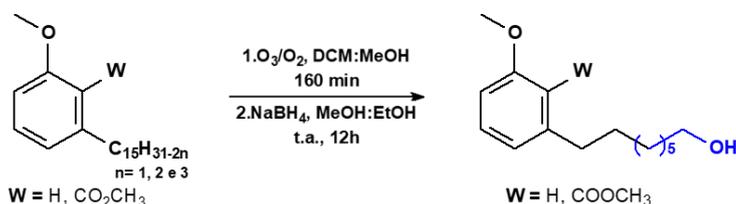
Tabela 4: Misturas O-metiladas LDT27i (**29**) e LDT28i (**30**): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C .



Código	Rendimento (%)	Fator de Retenção (Rf) ^a	RMN de ^1H (δ , ppm) OCH ₃	RMN de ^{13}C (δ , ppm) OCH ₃
LDT27i (29)	67	0,32	3,82 ^b	55,0 ^b
LDT28i (30)	80	0,36	3,82 ^b	55,0 ^b
			3,91 ^c	52,9 ^c

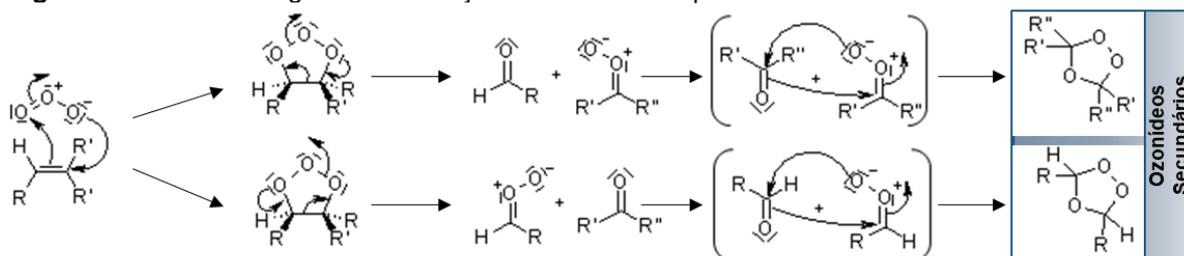
a. Hex_{95%}:AcOEt_{5%}; b. Metoxila fenólica; c. Carbometoxila

7.1.4 Obtenção dos álcoois LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**)



As misturas LDT27i (**29**) e LDT28i (**30**) foram individualmente submetidas à clivagem oxidativa da cadeia lateral por meio de fluxo de ozônio em banho de gelo à temperatura de 0 °C. O ozônio oxida duplas ligações de compostos olefínicos levando a ozonídeos primários, que instáveis, rearranjam a diferentes ozonídeos secundários. A formação destes ozonídeos está representada na Figura 21.

Figura 21: Mecanismo geral de formação dos ozonídeos primários e secundários.



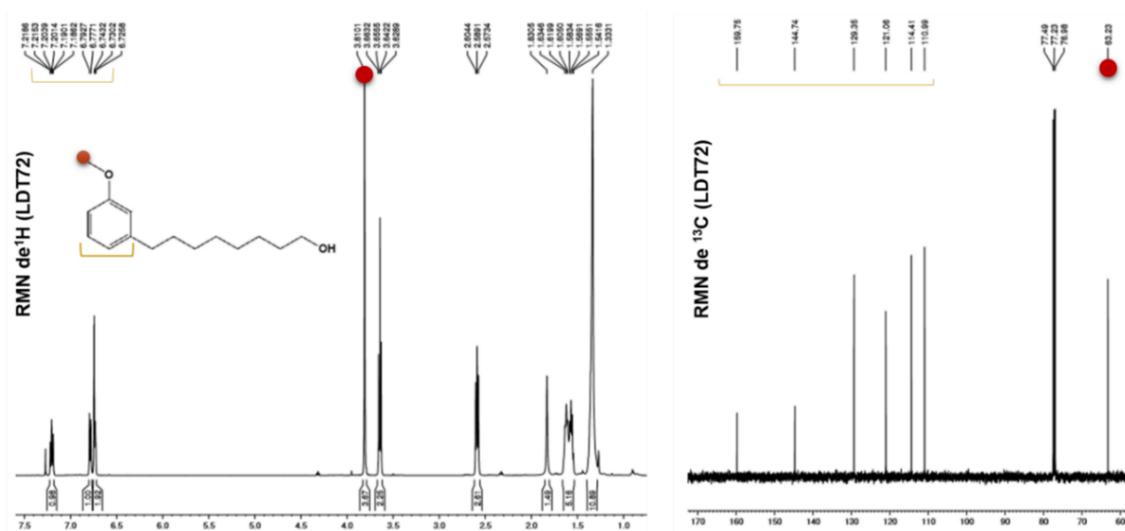
Fonte: Adaptado de GELETNEKY, C. e BERGER, S., 1998.

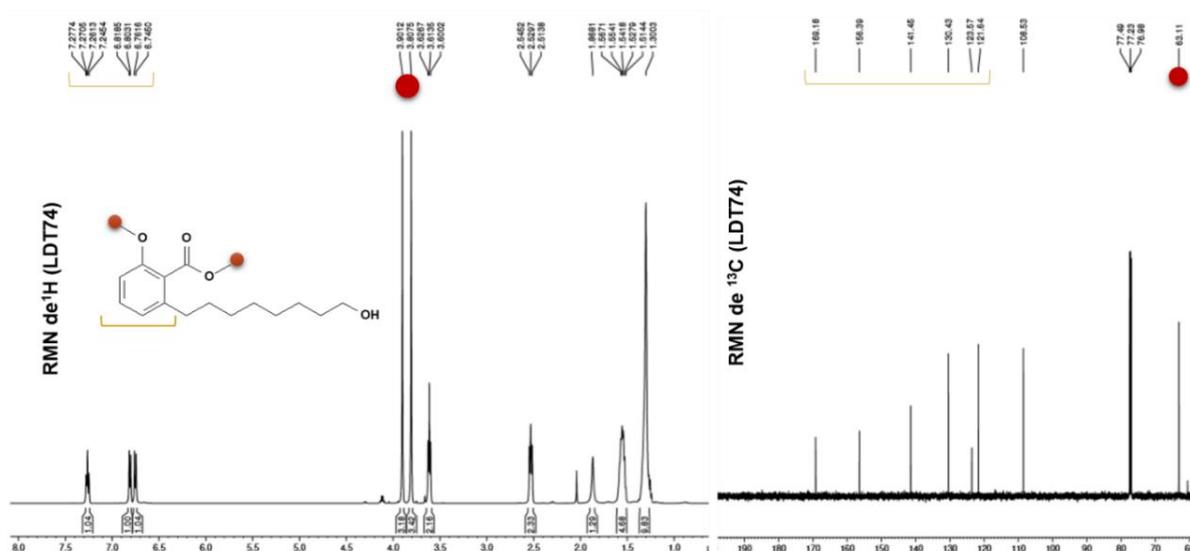
Uma vez que o ozônio é um oxidante forte, as reações de ozonólise geralmente são realizadas à temperatura aproximada de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, com uso de banho de gelo seco/acetona, para evitar reações laterais (ORNUM, S.G.V., et al, 2006). Diferentemente dos trabalhos anteriores do laboratório, em que utilizamos aparelho BRO₃-HA com fluxo de ozônio de 10 g/h (BrasilOzônio[®]), neste trabalho utilizamos um novo aparelho, GO3500AA-INX, com fluxo de O₃ de 3,5 g/h (OzônioLine[®]). Devido à menor produção de ozônio do novo equipamento, percebemos a baixa conversão das reações à temperatura $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neste sentido, investigamos o uso de banho de gelo/água (0°C) que se mostrou viável para os produtos de partida sem a formação de reações laterais.

Após a formação dos intermediários ozonídeos secundários, estes foram submetidos à redução com boroidreto de sódio aos álcoois correspondentes, LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**), obtidos como óleos amarelo claro em rendimentos de 68 % e 72 % respectivamente.

A análise espectroscópica por RMN dos compostos **27** e **28** (ANEXOS, 03, 04, 05 e 06, pág. 143-147) evidenciou a ausência dos assinalamentos referentes aos grupos metilídenos e metileno terminal (para o trieno). A manutenção da cadeia alifática com 8 grupos metilenos e a integridade do anel aromático foi observada. A presença dos sinais referentes ao metileno contendo o grupo hidroxila alcoólico (C₁) entre 3,60 ppm e 3,80 ppm nos espectros de RMN de ¹H e em torno de 63,0 ppm nos espectros de RMN de ¹³C corrobora a obtenção dos intermediários (Figura 22).

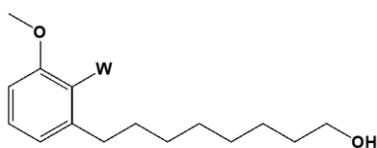
Figura 22: espectros de RMN de ¹H e em torno de 63,0 ppm nos espectros de RMN de ¹³C dos derivados **27** e **28**





Um resumo sobre as características de reação, físico-químicas e espectroscópicas de RMN das misturas LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**) estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5: Álcoois LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C .

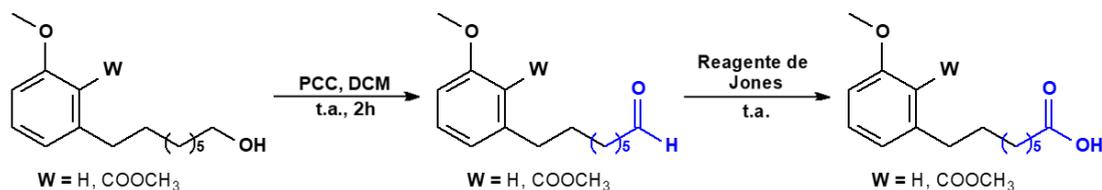


LDT72 (27, W= H)
LDT74 (28, W= CO₂CH₃)

Código	Rendimento (%)	Fator de Retenção (Rf) ^a	RMN de ^1H (δ , ppm) CH ₂ OH	RMN de ^{13}C (δ , ppm) CH ₂ OH
LDT72 (27)	68	0,44	3,64	63,2
LDT74 (28)	72	0,33	3,80	63,1

a. CH₂Cl₂

7.1.5 Obtenção dos derivados ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**):



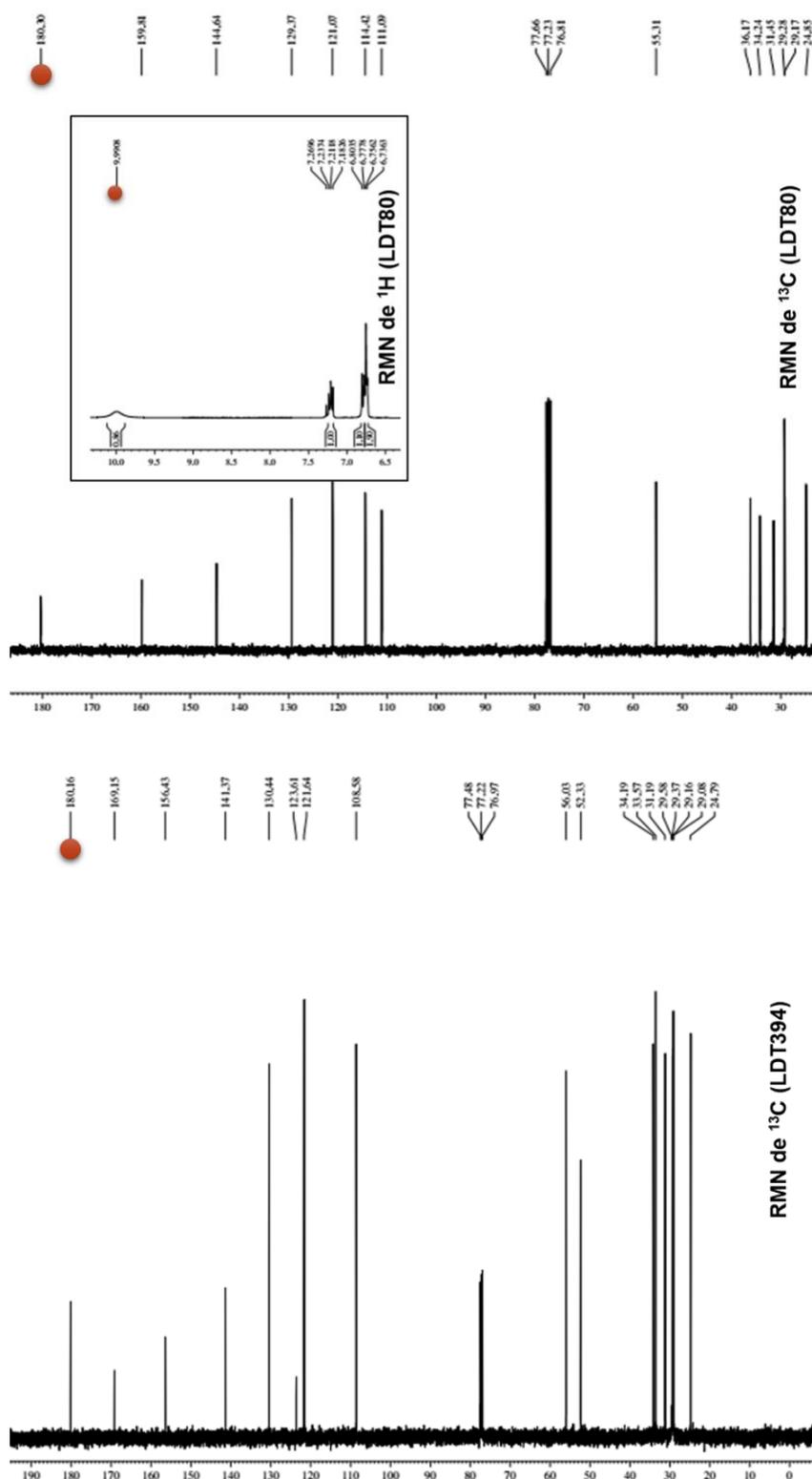
A obtenção dos derivados ácidos foi realizada em duas etapas consecutivas sem caracterização do intermediário aldeído. Neste sentido, os álcoois LDT72 (**27**) e LDT74 (**28**) foram convertidos aos respectivos aldeídos com clorocromato de piridínio (PCC)¹ em diclorometano anidro, identificados por Rf 0,6 (Hex₉₀ %: AcOEt₁₀ %). Após coluna flash para separação dos óxidos de cromo os compostos aldeídos, intermediários, foram oxidados com reagente de Jones² aos ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**), obtidos como sólido branco e óleo amarelo claro, respectivamente, em rendimentos de 83 % e 70 %.

Na análise dos espectros de RMN de ¹³C foram observadas as ausências dos deslocamentos químicos referentes ao metileno alcoólico em torno de 63,0 ppm e surgimento de sinais em 180,0 ppm referente aos grupos carboxila dos derivados **23** e **24**. Uma vez que o deslocamento químico do hidrogênio do grupo carboxila pode flutuar de 0,5 ppm a 10,0 ppm, identificamos apenas o sinal para o derivado **24** em 9,99 ppm no espectro de RMN de ¹H (ANEXOS 07, 08, 09 e 10, pág. 147-150), evidenciados na Figura **23**.

¹ Agente oxidante brando que oxida álcoois primários a aldeídos em solventes anidros

² Agente oxidante forte que oxida álcoois primários e aldeídos a ácidos carboxílicos

Figura 23: Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **23** e espectros de RMN de ^1H do derivado **24**.



Um resumo sobre as características de reação, físico-químicas e espectroscópicas de RMN dos derivados LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**) estão ilustrados na Tabela 6.

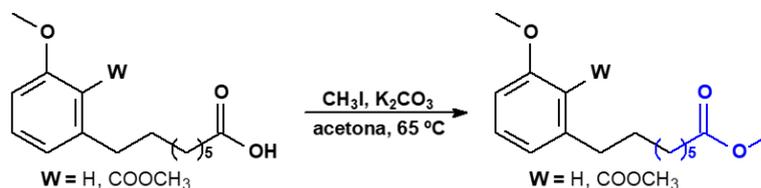
Tabela 6: Ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C .

LDT80 (**23**, W= H)
LDT394 (**24**, W= CO₂CH₃)

Código	Rendimento (%)	Fator de Retenção (Rf) ^a	RMN de ^1H (δ , ppm) COOH	RMN de ^{13}C (δ , ppm) COOH
LDT80 (23)	83	0,55	9,99	180,3
LDT394 (24)	70	0,46	--	180,3

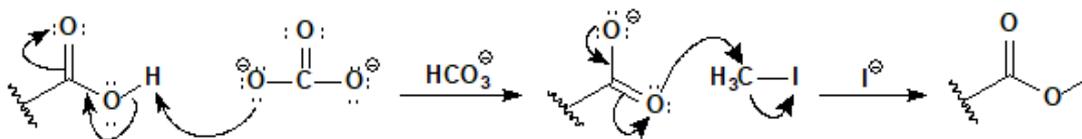
a. CHCl_3 85%: EtOH_{15}

7.1.6 Obtenção dos derivados metilésteres LDT483 (**31**) e LDT395 (**32**):



Os derivados ácidos LDT80 (**23**) e LDT394 (**24**) foram convertidos aos respectivos ésteres LDT483 (**31**) e LDT395 (**32**) pela reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) com iodeto de metila em meio básico de carbonato de potássio (Figura 24). Desta forma foram obtidos como óleos amarelo claros respectivos em rendimentos de 65 % e 70 %.

Figura 24: Mecanismo geral da reação de esterificação via $\text{S}_{\text{N}}2$.



Além das ausências dos deslocamentos químicos referentes ao grupo carboxila em torno de 180,0 ppm no espectro de RMN de ^{13}C , os grupos carbometóxi dos ésteres **31** e **32** foram confirmados pela presença dos sinais referentes ao grupo metoxila em torno de 3,67 ppm nos espectros de RMN de ^1H (ANEXOS, 10 e 12, pág. 149 e 151), corroborados pelos sinais em 174,4 ppm no RMN de ^{13}C referente à subunidade carbonila (ANEXOS 11 e 13, pág. 150 e 152).

Um resumo sobre as características de reação, físico-químicas e espectroscópicas de RMN dos derivados LDT483 (**31**) e LDT395 (**32**) estão ilustrados na Tabela 7.

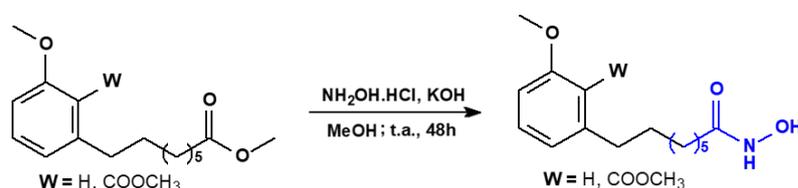
Tabela 7: Ésteres metílicos LDT483 (**31**) e LDT395 (**32**): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C .

LDT483 (31, W= H)
LDT395 (32, W= CO₂CH₃)

Código	Rendimento (%)	Fator de Retenção (Rf)	RMN de ^1H (δ , ppm) CO ₂ CH ₃	RMN de ^{13}C (δ , ppm) CO ₂ CH ₃
LDT483 (31)	70	0,51 ^a	3,67	174,4
LDT395 (32)	65	0,70 ^b	3,66	174,4

a. Hex 95%: AcOEt 5%; b. Hex 85%: AcOEt 15%

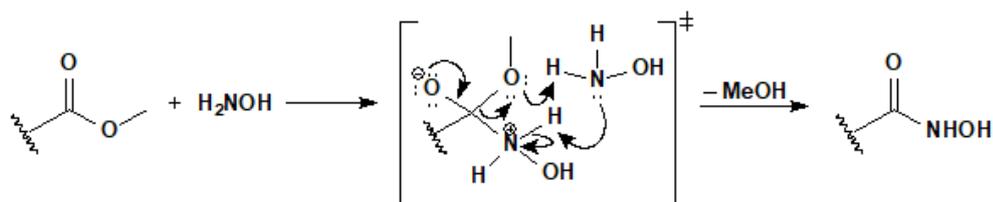
7.1.7 Obtenção dos ácidos hidroxâmicos



De posse dos compostos ésteres LDT483 (**31**), LDT395 (**32**), estes foram submetidos à reação de hidroxilaminólise com solução metanólica de hidroxilamina para a obtenção dos ácidos hidroxâmicos. Nesta reação de aminólise, o grupo hidroxilamina substitui a metoxila do éster levando à *N*-hidroxâmida. Para tanto, o par

de elétrons do nitrogênio ataca a carbonila como centro eletrofílico do éster levando ao intermediário tetraédrico. Na recomposição do grupo carbonila há transferência do próton da hidroxilamida, via auxílio de outra molécula de hidroxilamina – em excesso de 18 vezes – com eliminação de metanol que corresponde ao solvente da reação (Figura 25).

Figura 25: Mecanismo geral da síntese de aminólise com hidroxilamina.



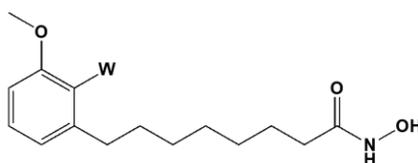
Gediya e colaboradores (2005) descrevem a síntese do SAHA (**15**) em que a etapa de formação do ácido hidroxâmico, a mesma empregada neste estudo, ocorre em 1 hora em rendimento de 90 %. Entretanto, os derivados do LCC não apresentaram conversão no tempo relatado. Neste sentido, realizamos estudos de acompanhamento por CCD para estabelecimento do tempo reacional para formação dos compostos alvo. Desta forma, identificamos o tempo de 48 horas para obtenção dos hidroxamatos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) em respectivos rendimentos de 36 % e 48 %.

Uma vez que o solvente da reação é polar prótico, o par de elétrons do nitrogênio da hidroxilamina interage por meio de ligação de hidrogênio diminuindo sua nucleofilicidade e, portanto, sua capacidade de atacar o centro eletrofílico do éster. Desta forma, visando a otimizar o rendimento e diminuir o tempo reacional, decidimos alterar o protocolo de Gediya e colaboradores (2005), submetendo à reação de hidroxiaminólise a refluxo, entretanto houve formação apenas de produtos laterais.

As subunidades hidroxâmicas dos derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) foram caracterizadas pela variação dos deslocamentos químicos referentes às carbonilas de 174,4 ppm nos ésteres para respectivos 171,4 ppm e 171,7 ppm nos espectros de RMN de ¹³C. Para o derivado LDT536 (**25**) foi ainda observado sinal em 8,61 ppm referente ao próton do nitrogênio amídico da subunidade *N*-hidroxiamida.

Um resumo sobre as características de reação, físico-químicas e espectroscópicas de RMN dos derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8: Ácidos hidroxâmicos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**): Rendimento, fator de retenção e sinais espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C .

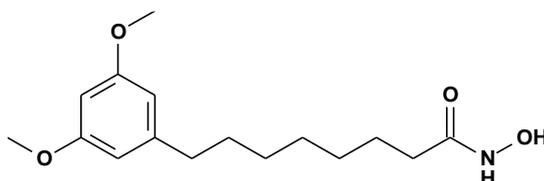


LDT536 (25, W= H)
LDT537 (26, W= CO₂CH₃)

Código	Rendimento (%)	Fator de Retenção (Rf) ^a	RMN de ^1H (δ , ppm) <u>CO₂NHOH</u>	RMN de ^{13}C (δ , ppm) <u>CO₂NHOH</u>
LDT536 (25)	36	0,46	8,61	171,4
LDT537 (26)	48	0,57	--	171,7

a. AcOEt;

7.1.8 Estudos visando a obtenção do hidroxamato cardanólico LDT538 (**31**)



As metodologias sintéticas empregadas para a obtenção dos derivados LDT536 (**20**) e LDT537 (**21**) também foram aplicadas à mistura de cardois LDT105i (**18**), no entanto, as etapas apresentaram baixas conversões e a presença de muitos produtos laterais indesejáveis.

Para a etapa de formação do produto final, foi avaliado o uso de refluxo durante 24 horas que levou à formação de produtos laterais. O procedimento foi repetido à temperatura ambiente e acompanhado por CCD, mas apenas depois de 96 horas foi identificada a formação do produto. A análise espectroscópica do derivado LDT538 (**31**), apresentou impurezas, por isso não foi submetido aos testes posteriores. As reações utilizando derivados do cardol são laboriosas e, geralmente, levam à formação de subprodutos em face da reatividade deste derivado. Desta forma, há

necessidade de estudos mais aprofundados sobre as características eletrônicas desses compostos visando a otimizar suas características reacionais.

As metodologias sintéticas individuais empregadas para a obtenção dos análogos hidroxâmicos, de modo geral, apresentaram bons rendimentos que variaram de 36 % a 83 % para o derivado LDT536 (**25**) e de 48 % a 80 % para o derivado LDT537 (**26**). Desta forma, as 5 etapas permitiram a obtenção dos derivados **25** e **26** em respectivos rendimentos globais de 6,8 % e 8,8 %, enquanto para o LDT538 (**31**) este foi apenas de 0,11 %.

7.1.9 Estudos metodológicos visando otimização de etapas

A reação de ozonólise consiste, num primeiro momento, na adição de ozônio à dupla ligação de alcenos, formando anel de 5 membros conhecido como molozonídeo ou ozonídeo primário. Este sofre rearranjo envolvendo a clivagem das ligações carbono-carbono gerando novos anéis de 5 ou 6 membros com diferentes combinações das cadeias carbônicas clivadas. Diferente do ozonídeo primário, os ozonídeos secundários são estáveis e podem ser tratados com diferentes agentes redutores ou oxidantes para conversão a aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos.

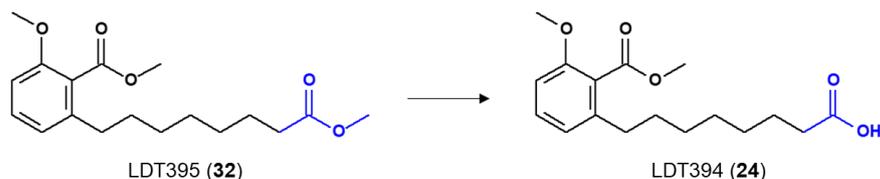
Seguindo a metodologia empregada por Tymer e colaboradores (2002), o método (a) que consiste na reação de ozonólise seguida da redução com zinco para a obtenção do derivado aldeído LDT393 (**33**). A reação levou à formação do produto desejado em rendimento de 53 %, que foi identificado por R_f de 0,64 (HEX₈₀ %: AcOEt₂₀ %). Na etapa de purificação, a impureza foi identificada por meio de padrão de CCD como sendo o derivado ácido LDT394 (**24**), obtido em aproximadamente 40 %. Devido à reatividade do aldeído, que sofre oxidação espontânea a ácidos carboxílicos pelo oxigênio do ar, não foi realizada a análise espectroscópica, mas sua presença foi confirmada por meio do revelador 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). A obtenção da mistura aldeído-ácido diretamente do intermediário ozonídeo elimina as etapas de redução dos ozonídeos secundários ao álcool LDT74 (**28**) e a oxidação com PCC ao aldeído LDT393 (**33**), cujo objetivo principal seria a obtenção do ácido LDT394 (**24**).

Neste sentido, foi investigada a oxidação direta dos ozonídeos secundários do derivado LDT28i (**30**) ao ácido carboxílico **24** baseados nos estudos de Cochram, B. M. (2016). Neste estudo, acetonitrila e água foram utilizadas como solventes até a obtenção dos ozonídeos secundários. Em seguida, estes foram submetidos a tratamento oxidativo com clorito de sódio como metodologia mais verde, devido à eliminação do uso de metais pesados como o cromo. Desta forma, esta metodologia (b) levou à obtenção do derivado LDT394 (**24**) em rendimento de 75 %, que apresentou Rf de 0,46 (Hex₈₅ %: AcOEt₁₅ %). Este procedimento mostrou-se superior, quando comparado às duas etapas necessárias para chegar ao mesmo intermediário ácido, tanto pelo rendimento global quanto pela economia de átomos.

No terceiro estudo metodológico, utilizando o procedimento descrito por XU e colaboradores (2010) que propuseram o uso de hidróxido de sódio em mistura de diclorometano e metanol (1:1) durante o processo de ozonólise levando a mistura LDT28i (**30**) ao éster metílico LDT395 (**32**). Desta forma, obtivemos o éster **32** em rendimento de 43 %, que foi identificado em CCD com Rf de 0,70 (HEX₈₅ %: AcOEt₁₅ %).

Devido ao pH básico e a presença de água no meio, gerada pela umidade quando da formação do ozônio pelo aparelho, essa metodologia também levou à formação do derivado ácido LDT394 (**24**) por meio de hidrólise (Figura **26**). Ainda que tenha havido perda do éster em função da hidrólise ao ácido, o rendimento para esta etapa foi superior aos 33 % observados no rendimento global até esta etapa. Como a presença de base é relevante para a formação do éster metílico, planejamos utilizar outras bases como metóxido de sódio (nucleofílico) – que poderia aumentar o rendimento do produto desejado – ou *tert*-butóxido de potássio (não nucleofílico) para otimizar estas etapas futuramente.

Figura 26: Hidrólise regioseletiva do derivado **32** para o **24**.



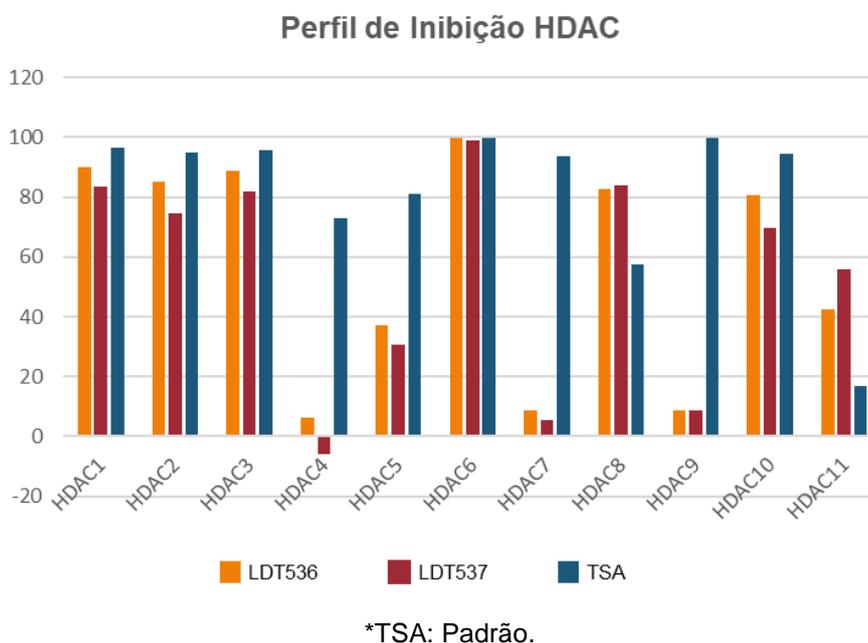
Baseando-se no estudo de Xu e colaboradores, foi proposto a etapa (d) para a síntese direta do derivado LDT537 (**26**) adicionando à reação 18 equivalente do cloridrato de hidroxilamina e 18 equivalentes a mais de hidróxido de sódio. Por meio deste método não foi possível obter o composto-alvo **26**, porém, obteve-se o composto oxima em rendimento de 18 %.

Uma vez que o rendimento global para obtenção do hidroxamatos LDT537 (**26**) foi de 8,8 % e envolveu 5 etapas, o presente estudo proporcionou sua obtenção em apenas duas etapas – O-metilação e ozonólise com tratamento com hidroxilamida em meio básico – em rendimento global de 14 % superior ao anteriormente obtido. Esta alternativa mais direta para obtenção dos ácidos hidroxâmicos envolveu economia de átomos com diminuição de etapas e geração de resíduos, consistente com os objetivos do grupo de desenvolvimento de fármacos sustentáveis aportados na bioeconomia.

7.2 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE ATIVIDADE *IN VITRO*

7.2.1 Avaliação do perfil de atividade inibitória de histonas desacetilases humanas (hHDACs)

Os compostos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) foram submetidos à avaliação *in vitro* do perfil de atividade frente a histonas desacetilases humanas da classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10) e classe IV (HDAC11) realizada por Reaction Biology Corporation (RBC). Os resultados da atividade inibitória dos compostos-alvos encontram-se no Gráfico 1.

Gráfico 1: Perfil de inibição dos compostos **25** e **26**.

Os resultados obtidos confirmam o planejamento racional pela funcionalização dos derivados do LCC que apresentaram perfil *pan*-HDAC frente às histonas desacetilases humanas. Os derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) apresentam atividade inibitória frente às histonas desacetilases humanas das classes I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8), IIb (HDAC6, HDAC10) e IV (HDAC11) sendo classificados como inibidores *pan*-HDACs seletivos comparados à tricostatina A (**13**) ou ao SAHA (**15**) (Figura 13).

Particularmente, os derivados **25** e **26** apresentam diferentes perfis de atividade para cada classe de HDAC. Neste sentido, considerando a classe I – HDAC1 (LDT536: 90 %; LDT537: 83 %), HDAC2 (LDT536: 85 %; LDT537: 74 %), HDAC3 (LDT536: 89 %; LDT537: 82 %) e HDAC8 (LDT536: 82 %; LDT537: 83 %), os derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) mostram inibição de todas as HDACs com percentual variando de 74 % a 90 %.

Considerando a classe II, esta pode ser dividida nas classes IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9) e IIb (HDAC6 e HDAC10). A avaliação do perfil frente às HDACs da classe IIa – HDAC4 (LDT536: 6 %; LDT537: 0 %), HDAC5 (LDT536: 37 %; LDT537: 30 %), HDAC7 (LDT536: 8 %; LDT537: 5 %) e HDAC9 (LDT536: 8 %;

LDT537: 8 %) – revela que os derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) são inativos (0 %) ou apresentam percentual de inibição menor que 50 %, variando de 5 % a 37 %). Por outro lado, **25** e **26** inibiram as HDACs da classe IIb – HDAC6 (LDT536: 99 %; LDT537: 98 %) e HDAC10 (LDT536: 80 %; LDT537: 69 %) – com percentual variando de 69 % a 99 %, com destaque para a HDAC6.

Por fim, os derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) apresentam perfis distintos quanto à capacidade de inibir a HDAC11 – representante da classe IV – em que **25** tem inibição de 42 %, portanto abaixo do limite de corte de 50 %, enquanto **26** inibe a HDAC11 um pouco acima do mesmo limite com percentual de inibição da atividade enzimática em torno de 55 %.

Tomando o perfil de inibição a partir de 50 %, o derivado LDT536 (**25**) tende a atuar, em concentração a 10 μ M, como inibidor seletivo para as HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8 (classe I) e HDAC6 e HDAC10 (classe IIb). Por sua vez, o derivado LDT537 (**26**) tende a atuar, na mesma concentração de 10 μ M, como inibidor seletivo para as HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8 (classe I), HDAC6 e HDAC10 (classe IIb) e HDAC11 (classe IV). Portanto, quando comparado à tricostatina A (**13**) ou ao SAHA (**15**), os derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) podem ser classificados como inibidores *pan*-HDAC seletivos.

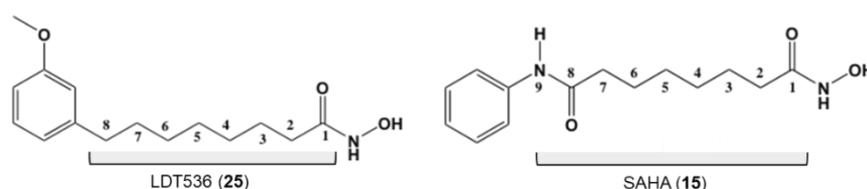
Estudos adicionais desenvolvido por Romeiro e colaboradores, determinaram os valores de Cl_{50} submicromolares frente às HDAC1 e HDAC6 para **25** (Cl_{50_HDAC1} : 316,2 nM e Cl_{50_HDAC6} : 190,1 nM) e **26** (Cl_{50_HDAC1} : 774,7 nM e Cl_{50_HDAC6} : 215,4 nM) na mesma ordem de grandeza encontrada para o SAHA (**15**, Cl_{50_HDAC1} : 195,5 nM e Cl_{50_HDAC6} : 41,9 nM). Adicionalmente, foram determinados os valores de pKa de 9,65 para LDT536 (**25**) e 9,58 para LDT537 (**26**).

Uma vez que a modulação dos perfis de inibição está diretamente relacionada às diferenças estruturais, a primeira consideração sobre as particularidades nos arcabouços moleculares dos derivados LDT536 (**25**), LDT537 (**26**) e SAHA (**15**) é a natureza e comprimento de seus espaçadores (*linker*). Para o SAHA (**15**), o espaçador, baseado na estrutura do ácido octanodióico (subérico), possui 6 unidades metilênicas (CH₂) e uma *N*-fenilamida com comprimento entre 10-12 Å para a

conformação estendida, sendo classificado como heterogêneo pela presença do átomo de nitrogênio da amida na cadeia.

Em termos de reconhecimento molecular, a presença da função amida no espaçador confere a presença de dipolos permanentes negativos para a carbonila e nitrogênio e dipolo positivo para o hidrogênio ligado ao nitrogênio em ressonância culminando no perfil de interação hidrofílico. Desta forma, o espaçador para o SAHA (**15**) possui ambos os perfis hidrofóbico e hidrofílico (biofórico). Por sua vez, ambos os derivados LDT536 (**25**), LDT537 (**26**) possuem espaçador com 7 unidades metilênicas e comprimento entre 12-14 Å para a conformação estendida, sendo, portanto, hidrofóbico pela presença exclusiva de dipolos transientes carbono-hidrogênio e induzido carbono-carbono (Figura 27).

Figura 27: Representação do espaçador dos compostos **25** e **15**.



A segunda variação ocorre na subunidade auxofórica CAP – responsável pela modulação do perfil de atividade observado. No SAHA (**15**), a subunidade CAP compreende o grupo fenila não-substituído, que confere perfil hidrofóbico aromático pela presença de dipolos transientes. Adicionalmente, devido à presença do átomo de nitrogênio diretamente ligado ao anel fenila, a densidade eletrônica no anel aromático é resultado dos efeitos eletrônicos indutivo retirador de elétrons (-I) pela eletronegatividade do nitrogênio bem como mesomérico doador (+M) e retirador (-M) de densidade eletrônica, originados quando o par de elétrons não-ligantes do átomo de nitrogênio está em ressonância com o anel aromático (+M) ou com a carbonila (-M), respectivamente. Para os derivados LDT536 (**25**), LDT537 (**26**), o padrão de substituição nos respectivos anéis aromáticos é diferente.

Para o derivado LDT536 (**25**), o anel aromático dissubstituído tem as presenças do grupo metoxila e da cadeia lateral, na posição *meta* à metoxila, que conferem perfil biofórico hidrofóbico aromático, considerando a presença de dipolos transientes, e

hidrofílico pelo dipolo negativo da metoxila que pode atuar nas interações de Keesom como acceptor de ligação de hidrogênio (ALH) e íon-dipolo com cátions em aminoácidos complementares. Por sua vez, a densidade eletrônica no anel aromático é resultado dos efeitos indutivos (I) – doador (+I) da cadeia lateral hidrofóbica e retirador (-I) do grupo metoxila – e mesoméricos (M) – doador (+M) tanto pelas duas estruturas hiperconjugativas do grupo metileno diretamente ligado ao anel quanto pelo par de elétrons não-ligantes do átomo de oxigênio do grupo metoxila em ressonância com o anel aromático.

Por sua vez, o derivado LDT537 (**26**) possui anel aromático trissubstituído que, além dos grupos metoxila e da cadeia lateral na posição *meta* à metoxila encontrada para derivado LDT536 (**25**), apresenta grupo carbometoxila – no carbono entre a metoxila e a cadeia lateral – que aumenta o caráter hidrofílico pela presença de dipolos negativos da carbonila e do segundo grupo metoxila capazes de atuar nas interações de Keesom como aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) e íon-dipolo com cátions em aminoácidos complementares. Adicionalmente, a presença do éster metílico altera a densidade eletrônica no anel aromático como resultado dos efeitos indutivo e mesomérico retiradores (-I, -M) do grupo carbometoxila ressonância com o anel aromático.

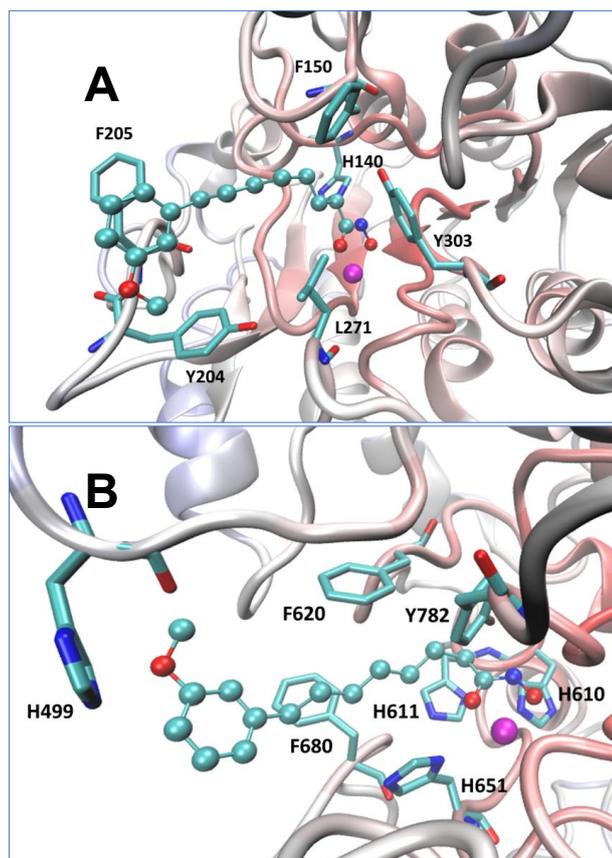
A funcionalização dos lipídeos fenólicos do LCC como modulador epigenético é oportuno para o desenvolvimento de novos medicamentos de baixo custo, acessível, bem como, a sua utilização vinculada a amplo espectro de patologias moduladas por histonas desacetilases.

Em patógenos fúngicos não se sabe como é regulada a instabilidade do genoma induzida pelo estresse, porém, há indícios que a regulação epigenética mediada pela cromatina apresenta papel fundamental nesse processo, uma vez que as enzimas eucarióticas são conservadas e as espécies fúngicas apresentam pelo menos seis homólogos das HDACs humanas (SMITH e EDLIND, 2002; BUSCAINO, 2019).

7.2.2 Estudo de docagem molecular frente a HDAC1 e HDAC6

Os estudos de docagem molecular do derivado LDT536 (**25**) frente às HDAC1 e HDAC6 (ROMEIRO, et al., 2019) evidenciaram interações do tipo íon-dipolo do grupo hidroxamato com o zinco por meio de quelação bidentada e estabilização por meio de interações polares com os resíduos de His140 e Tyr303 (HDAC1), e His610 e Tyr782 (HDAC6) (Figura 28). A cadeia alifática apresenta maiores contatos apolares em HDAC6 (com His611, Phe620, His651, Phe680 e Leu749) quando comparada à HDAC1 (Phe150, His178 e Leu271). Este resultado está de acordo com os achados da literatura uma vez que a enzima HDAC6 é caracterizada pela presença de bolsão hidrofóbico maior.

Figura 28: Estudo de docagem molecular do LDT536 (**25**)



Legenda: **A:** Interação do derivado LDT536 (**26**) com sítio catalítico da HDAC1; **B:** Interação do derivado LDT536 (**26**) com sítio catalítico da HDAC6. *Fonte:* ROMEIRO et al, 2019.

As enzimas histonas desacetilases, de um modo geral, possuem domínio catalítico com 300 a 400 resíduos de aminoácidos. Por sua vez, HDAC6 aparece como único membro com dois domínios catalíticos, o que resulta em estrutura mais volumosa (MEREK, 2018). Como observado na Figura **28**, a interação com a subunidade CAP pode ser favorecida com o aumento do espaçador ou grupos mais volumosos para maior aproximação com a His499, potencializando a interação.

A HDAC6 se apresenta como alvo interessante a ser explorado por apresentar características distintas dentro da classe. Estudo de docagem realizado por YANG e colaboradores (2018) revelou a presença de bolsão de reconhecimento molecular mais profundo e largo formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Isto sugere que moléculas com características hidrofóbicas, como os derivados do LCC, podem apresentar maior interação neste alvo.

O estudo realizado por Romeiro (2019) também elucidou a capacidade dos compostos **25** e **26** permearem, de forma passiva, a barreira hematoencefálica. Por meio do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela foi previsto que os compostos apresentariam biodisponibilidade no sistema nervoso central. Uma vez que a doença criptocócica está relacionada a características neurológicas, compostos antifúngicos que apresentem penetração no SNC e custo acessível para amplo acesso em países em desenvolvimento são de grande interesse para o desenvolvimento de novas terapias. A meningite criptocócica é caracterizada por complicações no tratamento devido à dificuldade de medicamentos que ultrapassem a barreira hematoencefálica.

As famílias Rpd3 e Hda1 além de desempenharem diversas funções nos mecanismos de virulência, também são conhecidas como reguladoras da desacetilação de Hsp90, que nos fungos age regulando os mecanismos de resistência. Sendo assim, estudos com inibidores HDACs para avaliação antifúngica, principalmente para as classes I e II, são estratégias relevantes para a diminuição da permanência, incidência e eliminação do fungo. A obtenção de inibidores mais seletivos ou sinérgicos dentro das classes I e II possibilitaria maior conhecimento da atuação desses compostos e se comprovada a sua atividade nas histonas desacetilases fúngicas, representaria uma melhor resposta ao tratamento de infecções causadas por esses patógenos.

Os sítios de interações das HDACs possuem grande similaridade dificultando a obtenção de ligantes seletivos. Uma vez que as HDACs humanas das classes I e II estão relacionadas às Rpd3 e Hda1 em fungos, XIAOFANG e colaboradores (2015) realizaram estudo no qual demonstraram que o uso do HDACi TSA (**13**) diminuiu a resistência a azóis em espécies de *C. albicans*.

Os derivados LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**), ainda que não apresentem o grupo amida na subunidade CAP e tenham espaçador hidrofóbico com menos um grupo metileno, validaram o planejamento apresentando atividade *pan*-HDAC assim como o SAHA (**15**).

7.2.3 Avaliação da sensibilidade em espécies fúngicas

O método de microdiluição em caldo para os testes de sensibilidade de compostos antifúngicos é utilizado para analisar a capacidade dos fungos crescerem em poços de placas de meio de cultura líquido contendo diluições seriadas dos compostos em determinado período de tempo (DRA, et al., 2022). Dado o crescente número de infecções invasivas causadas por fungos filamentosos resistentes aos antifúngicos, como o *S. brasiliensis*, protocolos como o M38-A2 do CLSI padronizam condições de testes de referência para a obtenção de resultados concordantes.

Os IC CEMM utilizadas no presente estudo pertencem à coleção do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM). Essa coleção apresenta foco primário em patógenos humanos e animais obtidos diretamente de processos infecciosos, microbiota ou meio ambiente (<https://www.cemm-ufc.org/micoteca> acessado em: 16/01/2021).

Os resultados para a sensibilidade *in vitro* dos derivados **25** e **26** para as formas planctônicas são apresentados na Tabela **9**.

Tabela 9: Sensibilidade *in vitro* de diferentes espécies fúngicas aos compostos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**), realizado por meio do método de microdiluição em caldo, protocolo estabelecido pelo CLSI.

Cepas/IC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)								
	LDT536 (25)			LDT537 (26)			SAHA (15)		
	Porcentagem de inibição do crescimento fúngico (%)								
	50	80	100	50	80	100	50	80	100
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>64	-	-	32	64	>64	>64	-	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	>64	-	-	>64	-	-	>64	-	-
<i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-079 ^(IC)	32	>64	-	8	64	>64	-	-	-
<i>C. neoformans</i> ATCC 90113	32	>64	-	16	32	>64	64	-	-
<i>C. neoformans</i> CEMM 03-1-105 ^(IC)	32	>64	-	16	32	>64	-	-	-
<i>S. brasiliensis</i> CEMM 05-3-050 ^(IC)	32	>64	-	16	32	>64	64	-	-
<i>S. brasiliensis</i> CEMM 05-3-075 ^(IC)	64	>64	-	16	64	>64	-	-	-

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima. Capaz de inibir 100%, 80% e 50% do crescimento fúngico em comparação com o crescimento fúngico nos poços sem a presença das substâncias.

Na avaliação da sensibilidade em células planctônicas nenhum composto foi capaz de inibir 100 % do crescimento fúngico nas concentrações testadas. De maneira geral, o composto LDT537 (**26**) mostrou melhor perfil inibitório que os compostos LDT536 (**25**) e SAHA (**15**) para a maioria dos isolados avaliadas, exceto para *C. tropicalis* ATCC 750 em que todos apresentaram resultado similar, com destaque para o IC CEMM 03-6079 (*C. tropicalis*) em que foi capaz de inibir 50 % do crescimento fúngico à concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$.

A comparação entre as CIM₅₀ dos compostos **25**, **26** e SAHA (**15**) – inibidor HDAC de referência para o planejamento dos novos compostos (**25** e **26**) – revelou melhor **15** apresentou perfil similar ao derivado LDT536 (**25**) para *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 750 (MIC₅₀ >64 $\mu\text{g/mL}$) e inferior para as demais avaliadas *i.e.* *C. neoformans* ATCC 90113 e *S. brasiliensis* CEMM 05-3-050.

O composto **15**, é classificado como inibidor *pan*-HDAC para as classes I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), Classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9), IIb (HDAC6 e HDAC10) e IV (HDAC 11), diferentemente dos compostos LDT536 (**25**) e LDT537 (**26**) não inibem a classe IIa, sendo, portanto, inibidores *pan*-HDAC seletivos.

Na homologia com os fungos, temos que a Classe I corresponde à Rpd3 e a classe II à Hda1. As HDACs IIa estão localizadas no núcleo e, após fosforilação por quinases, são transportadas para o citoplasma, já as HDACs IIb são localizadas no citoplasma, logo, atuam por meio de várias proteínas não-histona que são substratos para a atividade de desacetilação. (PULYA, et al., 2021). Estes resultados sugerem que os compostos **25** e **26** podem contribuir para maior sensibilidade.

Estudo realizado por Li e colaboradores (2022) avaliou uma série de doze compostos inibidores HDACs e o composto SAHA (**15**) em *C. albicans* e obtiveram CIM₈₀ maior que 64 µg/mL. No entanto, quando em sinergismo com o fluconazol (**3**), o perfil inibitório melhorou em até 16 vezes. Diversos estudos têm demonstrado o importante papel de inibidores HDACs para a atividade antifúngica quando testados para mecanismos de virulência ou em terapias combinadas para aumentar o potencial, a eficácia e seletividade fúngica, ao mesmo tempo em que reduz a evolução da resistência medicamentosa devido à diminuição de doses (PFALLER, et al., 2009; BRANDÃO, et al., 2016; LI, et al., 2015 RAJASEKHARAN, et al., 2018; MORAIS, et al., 2020; IYER, et al., 2021; LI, et al., 2021; RANJAN, et al., 2021; ZHU, T. et al., 2021). Neste contexto, o composto LDT537 (**26**), por apresentar melhor perfil inibitório que LDT536 (**25**), foi submetido ao teste de sinergismo com os antifúngicos azólicos fluconazol (**3**), voriconazol (**4**) e itraconazol (**34**).

7.2.4 Avaliação do sinergismo entre azóis e LDT537(**26**) em células planctônicas

A partir dos resultados de sensibilidade, o composto LDT537 (**26**) foi selecionado para avaliação da interação *in vitro* juntamente com os antifúngicos azólicos: fluconazol (**3**), itraconazol (**4**) e voriconazol (**34**). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 10. Os testes de interação foram realizados utilizando o método de tabuleiro de xadrez (*checkerboard*) no qual duas substâncias são combinadas em diferentes concentrações frente às células fúngicas. Após as leituras, os resultados encontrados foram inseridos no cálculo de concentração inibitória fracionada para encontrar o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). A interação foi classificada da seguinte forma: sinérgica (CIFI ≤ 0,5), indiferente (0,5 < CIFI ≤ 4,0) ou antagonico (CIFI > 4,0) (ODDS, 2003).

A combinação de dois compostos é chamada de sinérgica quando o efeito da combinação é maior que o efeito do composto sozinho, o que pode indicar dois alvos diferentes para sua ação. Para o sinergismo é interessante o uso de duas classes diferentes de medicamentos, a modo de evitar atividade competitiva (CHAND, et al., 2021).

Tabela 10: Avaliação da interação sinérgica do composto LDT 537 (26), SAHA (15) e compostos azólicos.

Cepas/IC		CIM ($\mu\text{g/L}$)			CIFI
		FLC	LDT537	FLC/LDT537	
Fluconazol	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	64	0.25/2	0.16 ^s
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0.5	128	0.50/2	1.01 ⁱ
	<i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-079 ^(IC)	64	16	0.25/2	0.13 ^s
	<i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-077 ^(IC)	64	64	0.25/2	0.03 ^s
		FLC	SAHA	FLC/SAHA	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	>64	2/16	0.75 ⁱ
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0.5	>64	0.50/8	1.13 ⁱ
Voriconazol		VRC	LDT537	VRC/LDT537	
	<i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-077 ^(IC)	8	64	0.125/2	0.05 ^s
		VRC	SAHA	VRC/SAHA	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.25	>64	0.25/16	1.25 ⁱ
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0.031	>64	0.06/8	2.13 ⁱ
Itraconazol		ITC	LDT537	ITC/LDT537	
	<i>S. brasiliensis</i> CEMM 05-3-050 ^(IC)	2	32	0.25/4	0.25 ^s
	<i>S. brasiliensis</i> CEMM 05-3-075 ^(IC)	2	64	0.25/4	0.19 ^s
		ITC	SAHA	ITC/SAHA	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1	>64	0.5/16	0.65 ⁱ
	<i>S. brasiliensis</i> CEMM 05-3-075 ^(IC)	4	64	2/4	0.59 ⁱ
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0.063	>64	0.125/8	0.65 ⁱ

Legenda: FLC: fluconazol; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol; CIM: concentração inibitória mínima. CIFI: índice de concentração inibitória fracionada. ^s: Sineergismo. ⁱ: Indiferente.

De maneira geral, a combinação do composto LDT537 (**26**) com todos os antifúngicos azólicos (FLC, VRC e ITC) mostrou atividade sinérgica, exceto para a cepa *C. tropicalis* ATCC 750 para a qual foi indiferente. Diferentemente, o composto de referência SAHA (**15**), não apresentou sinergia para as cepas e IC avaliados.

Considerando o agente antifúngico fluconazol (**3**), o derivado **26** foi capaz diminuir a concentração do fluconazol em 4 vezes para a *C. albicans* ATCC 10231 e em 256 vezes para *C. tropicalis* CEMM 03-6-079 e CEMM 03-6-077. Por sua vez, ainda que não tenha sido evidenciado sinergismo para *C. tropicalis* (ATCC 750), houve redução da concentração do derivado **26** em 64 vezes na presença do fluconazol. Os resultados apontam para a hipótese de que **26** parece atuar nos mecanismos significativos na proliferação, no entanto, estudos específicos são necessários para corroborar essa ação. Adicionalmente, os dados sobre cepas de *C. tropicalis* mostram que o composto **26** apresentou melhor resposta para isolados clínicos comparada à ATCC.

Por sua vez, a combinação entre o voriconazol (**34**) e **26** mostrou sinergismo para a único IC avaliada (*C. tropicalis* CEMM 03-6-077) enquanto foi indiferente para **15** nas cepas testadas (*C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 750). Neste sentido, **26** diminuiu a CIM do voriconazol (**34**) em 64 vezes para IC de *C. tropicalis* CEMM 03-6-077 considerada mais resistente.

Por fim, a combinação entre itraconazol (**4**) e os inibidores HDAC **26** e **15** para os IC de *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-050 e CEMM 05-3-075) mostrou sinergismo para o composto **26** com redução da CIM para o itraconazol em 8 vezes. Por sua vez o SAHA (**15**) não apresentou sinergismo.

O composto LDT537 (**26**) aumentou a atividade dos azóis contra *Candida spp.* e *S. brasiliensis*, reduzindo as CIM antifúngicas observadas. Em tese, a atividade sinérgica, foi benéfica, diminuindo as concentrações dos compostos, o que para uso clínico, pode reduzir toxicidade por meio da redução das doses, retardar ou impedir o desenvolvimento de resistência e prevenir o aparecimento de mutantes (SPITZER, et al., 2017).

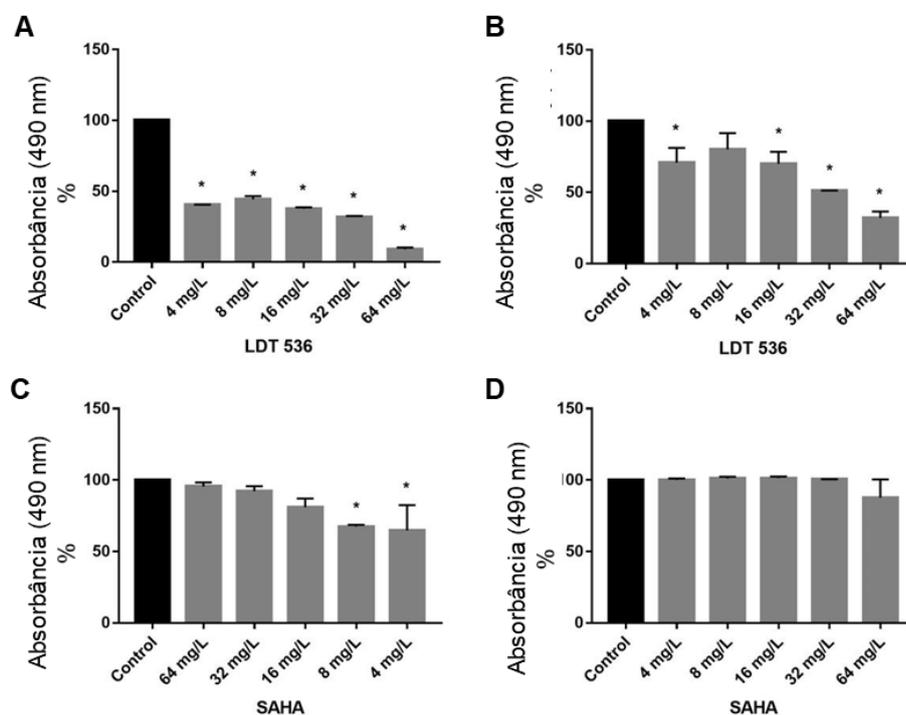
O alinhamento das espécies fúngicas, bem como os ensaios com o composto **25** constituem as perspectivas deste estudo para determinar o melhor composto com atividade sinérgica. No entanto, os resultados obtidos, apontam o composto **26** como inibidor de histonas desacetilase, obtido de uma fonte natural e abundante no Brasil,

com atividade sinérgica contra as cepas e IC fúngicos de *C. albicans* – espécie patogênica relacionada a óbitos – e *C. tropicalis* – espécie emergente com elevada resistência. Adicionalmente, foi observada atividade sinérgica para *S. brasiliensis*, fungo zoonótico emergente no Brasil, principalmente em felinos. A fim de explorar outras potencialidades desses compostos, LDT536 (25), LDT537 (26) e SAHA (15) foram submetidos ao teste de sensibilidade em células sésseis.

7.2.5 Avaliação da sensibilidade em células sésseis

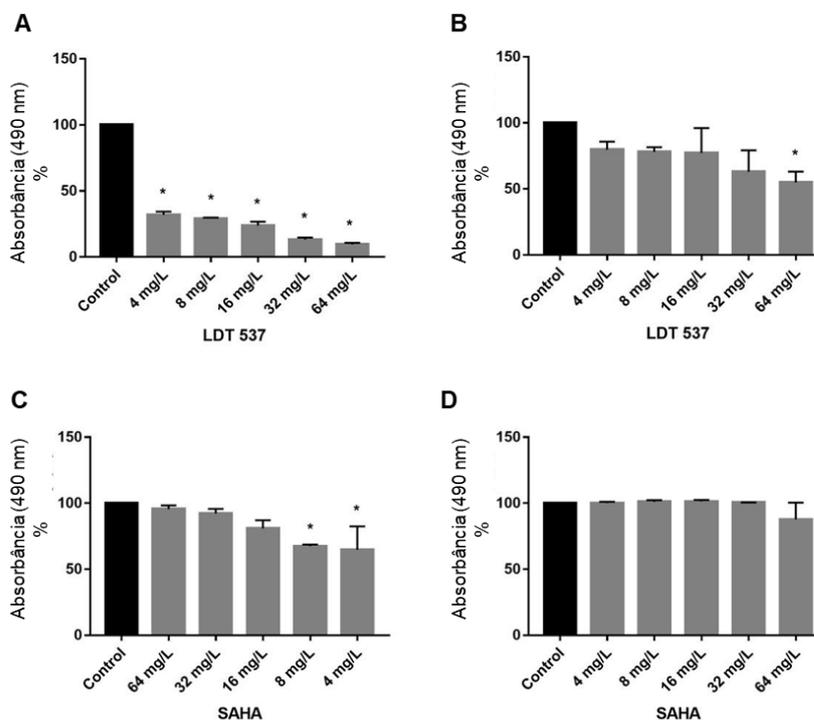
Os resultados da sensibilidade em células sésseis estão expressos em porcentagem de atividade metabólica sendo estabelecido o controle como 100 % de atividade metabólica. Os resultados obtidos para os compostos LDT536 (25) e SAHA (15) e LDT537 (26) e SAHA (15) para *C. albicans* e *C. tropicalis* estão representados na forma gráfica nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

Figura 29: Sensibilidade de biofilmes em formação de *Candida* spp. dos compostos LDT536 (25) e SAHA (15) para *C. albicans* ATCC 10231 (A e C) e *C. tropicalis* ATCC 750 (B e D).



Legenda: O controle representa o biofilme sem a adição dos compostos. Os resultados estão expressos em porcentagem de atividade metabólica, sendo estabelecido o controle como 100 % de atividade metabólica.

Figura 30: Sensibilidade de biofilmes em formação de *Candida* spp. dos compostos LDT537 (**26**) e SAHA (**15**) para *C. albicans* ATCC 10231 (A e C) e *C. tropicalis* ATCC 750 (B e D).



Legenda: O controle representa o biofilme sem a adição dos compostos. Os resultados estão expressos em porcentagem de atividade metabólica, sendo estabelecido o controle como 100 % de atividade metabólica.

Os dois compostos-alvos, **25** e **26**, apresentaram melhor perfil inibitório na formação de biofilmes em comparação com o SAHA (**15**). Para *C. albicans*, LDT537 (**26**) apresentou redução de 50 % na produção de biofilme em todas as concentrações testadas, com excelente perfil na concentração de 4 µg/mL. Já para *C. tropicalis*, foi observada redução de 50 % na formação do biofilme apenas pelo composto LDT536 (**25**) na concentração de 32 µg/mL (Figura 29).

Uma das barreiras na efetividade do tratamento terapêutico é a penetração da matriz extracelular que age como barreira dificultando a difusão dos antifúngicos. As células sésseis constituem fator de virulência fúngica que permite a sobrevivência em ambientes hostis, bem como a adesão em superfícies. Fatores de resistência medicamentosa e.g. o aumento da expressão de proteínas, bombas de efluxo, modificações na composição da membrana plasmática e a matriz extracelular, participam da manutenção da sobrevivência e proliferação de biofilmes (BEERMAN e KRYSAN, 2020; SERAFINI et al., 2021). Os resultados das CIM₅₀ e CIM₉₀ para os compostos LDT536 (**25**), LDT537 (**26**) e SAHA (**15**) para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. neoformans* estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Inibição da formação de biofilme de *Candida* spp., *C. neoformans*, de *S. brasiliensis* (forma filamentosa).

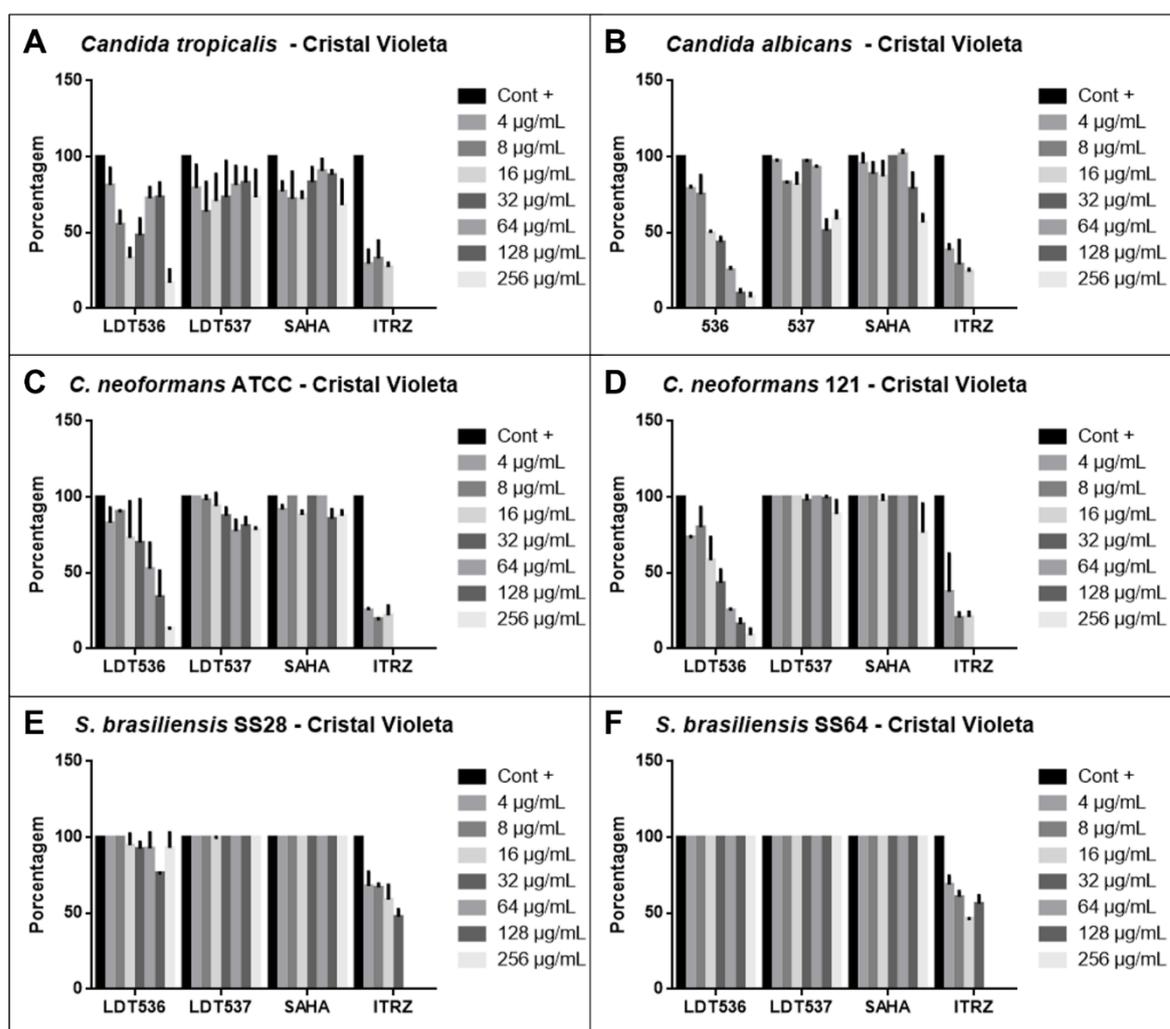
Compostos	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. tropicalis</i> ATCC 750		<i>C. neoformans</i> ATCC 90113		<i>C. neoformans</i> ATCC 121		<i>S. brasiliensis</i> CEMM 05-3-075		<i>S. brasiliensis</i> SS64 CEMM 05-3-050							
	(µg/mL)																	
	CIM	CIMS		CIM	CIMS		CIM	CIMS		CIM	CIMS		CIM	CIMS		CIM	CIMS	
		50	90		50	90		50	90		50	90		50	90		50	90
LDT536 (25)	256	32	>256	128	128	>256	64	256	>256	128	128	256	64	>256	>256	64	>256	>256
LDT537 (26)	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
SAHA (15)	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
VRC (34)	0,03	>16	>16	4	>16	>16	0,125	4	>16	0,125	>16	>16	16	8	>64	8	4	>64
ITC (4)	16	>16	>16	8	>16	>16	0,125	0,25	>16	0,25	0,25	>16	2	8	>32	2	8	>32
FCL (3)	0,06	>64	>64	4	>64	>64	8	64	>64	8	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

Legenda: CIM: Concentração inibitória mínima de células planctônicas; CIMS₅₀: concentração inibitória mínima de células sésseis capaz de inibir em 50% a atividade metabólica do biofilme; CIMS₉₀: concentração inibitória mínima de células sésseis capaz de inibir em 90% a atividade metabólica do biofilme.

Na formação de biofilme de *C. neoformans* apenas o composto **25** apresentou atividade inibitória relevante, no entanto, seu melhor resultado foi para os biofilmes de *C. albicans* em que, à concentração de 32 µg/mL, foi capaz de inibir a atividade metabólica em 50 % – valor 8 vezes inferior à CIM.

Para os biofilmes de *S. brasiliensis*, os compostos-alvo **25** e **26** não apresentaram inibição significativa. Os compostos foram analisados quanto à atividade na biomassa total dos biofilmes com cristal violeta. Para esta análise o composto LDT536 (**25**) apresentou maior capacidade inibitória sobre a biomassa total dos biofilmes de leveduras que sobre sua atividade metabólica, principalmente para as cepas *C. albicans* e *C. neoformans* ATCC 121 (Figura 31).

Figura 31: Inibição da biomassa total de biofilme de cepas de *Candida* spp., *C. neoformans* e *S. brasiliensis* (forma filamentosa).



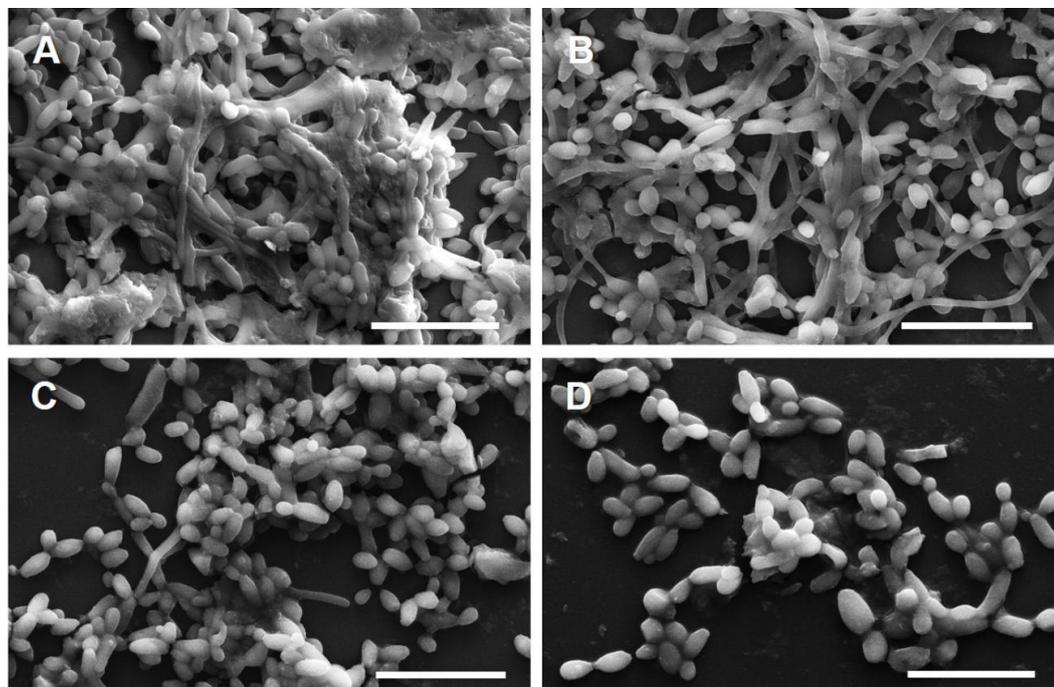
Legenda: Valores de absorbância convertidos para porcentagem, onde o controle positivo (sem adição de drogas) foi considerado com 100% da biomassa total. Itraconazol foi utilizado como exemplo para a atividade de antifúngicos clássicos frente às cepas analisada. Cont +: controle positivo, sem adição de drogas; ITRZ: itraconazol

Para a biomassa total, o composto **26** apresentou atividade significativa na maior concentração testada (256 µg/mL) para *C. albicans*, enquanto os melhores resultados foram para o composto **25**, principalmente para *C. tropicalis*. Este estudo sugere que o composto LDT536 (**25**) pode atuar sobre a formação do biofilme, mas não necessariamente causar danos sobre a célula fúngica. Dado que a inibição das enzimas HDACs fúngicas, classificadas em três tipos: Classe I (Rpd3a, Rpd3b, Hos1 e Hos2), classe II (Hda1 e Hos3) e classe III (Sir2 e Hst), são correlatadas ao favorecimento da redução na resistência antifúngica, a inibição dos fatores de virulência e formação de biofilmes em *C. albicans*, *C. neoformans* (LIU, et al., 2018), estes resultados estão em conformidade com os indicativos de atividade nas enzimas HDACs fúngicas, contudo, é necessário estudos específicos para corroborar este efeito.

7.2.6 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura

Uma vez que o composto LDT537 (**26**) exibiu boa resposta para *C. albicans* – uma das espécies mais presentes nas infecções nosocomiais e também de maior gravidade devido a infecção sistêmica – este foi submetido à avaliação por microscopia eletrônica de varredura. Nestas análises foi possível notar que o composto **26** reduz consideravelmente o número de células presente no biofilme de *C. albicans*. O biofilme perde complexidade e tem a sua quantidade de matriz reduzida. À medida que a concentração de **26** aumenta é possível observar redução na filamentação como observado na Figura **32**.

Figura 32: Imagens obtidas utilizando microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *Candida albicans* formado na presença de diferentes concentrações do composto LDT 537. **(A)** controle de crescimento sem o composto; **(B)** LDT 537 16 $\mu\text{g/mL}$, note a redução da produção de matriz extracelular; **(C)** LDT 537 32 $\mu\text{g/mL}$, há uma redução na produção de filamentos e desorganização na estrutura do biofilme; **(D)** LDT 537 64 $\mu\text{g/mL}$, pouco ou nenhum filamento é observado.



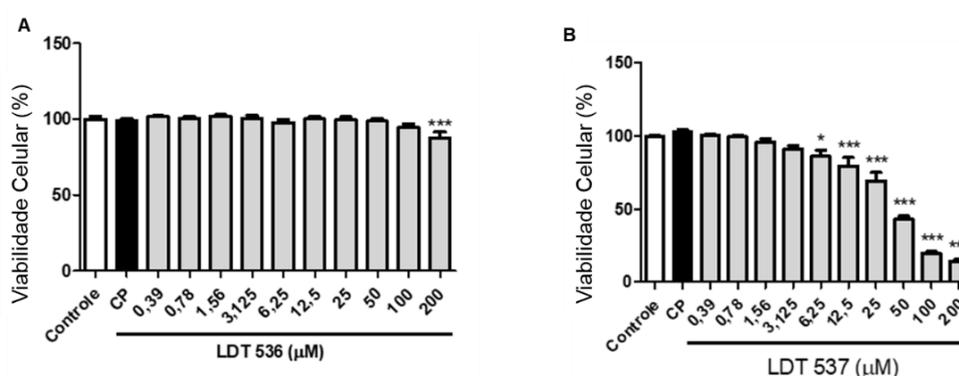
As células de *C. albicans* aderem a superfícies bióticas e abióticas. Após a adesão, essas células proliferam. Elas se alongam e proliferam ao longo da formação do biofilme. O biofilme é considerado maduro em aproximadamente 24 horas, caracterizado por mistura estruturada de células de levedura, pseudo-hifa e hifa (LOHSE, et al., 2018).

De acordo com os testes anteriores o derivado LDT537 (**26**) apresentou melhor perfil para *C. albicans* na inibição do biofilme. Os biofilmes de *C. albicans* possuem matriz altamente estruturada com células em forma de levedura, pseudo-hifas e hifas e podem ser formados em meio abiótico e biótico. Devido a essas características, os antifúngicos existentes são ineficazes para as células de biofilme (LOHSE, et al., 2018). Os resultados preliminares sugerem que a abordagem de inibidores HDACs para a ação antifúngica apresenta potencial atividade contra os fatores de virulências das espécies fúngicas analisadas.

7.2.7 Ensaio de citotoxicidade

Nos ensaios de citotoxicidade realizados com células RAW 264.7, o composto LDT536 (**25**) apresentou citotoxicidade apenas na concentração máxima de 200 μM (53,07 $\mu\text{g/mL}$). Por sua vez, LDT537 (**26**) se mostrou citotóxico a partir da concentração de 6,25 μM (2,02 $\mu\text{g/mL}$) como demonstrado na Figura 33.

Figura 33: Efeito dos compostos LDT536 (A) e LDT537 (B) na viabilidade celular em células RAW 264.7.



Legenda: Os valores são expressos como média \pm SEM de três determinações independentes. CP = controle positivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Controle (ANOVA, seguido pelo Teste de Student-Newman-Keuls).

Nos testes de toxicidade contra macrófagos murinos (células RAW 264.7), o derivado LDT536 (**25**) não apresentou efeito da dose letal mediana (DL_{50}) em nenhuma das concentrações testadas. Por sua vez, nas mesmas condições, o derivado LDT537 (**26**) mostrou DL_{50} em aproximadamente 16 $\mu\text{g/mL}$ (49 μM) – concentração próxima à que inibiu o crescimento fúngico. No entanto, na análise de sinergismo por combinação com antifúngicos azólicos, a concentração inibitória do composto LDT537 (**26**) diminuiu consideravelmente (2-4 $\mu\text{g/mL}$), abaixo da concentração tóxica contra células murinas (16,2 $\mu\text{g/mL}$) como demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12: Toxicidade dos compostos **26** e **27**.

Composto	CIM ₅₀		Toxicidade		SI
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	
LDT536 (25)	32	120,6	53,1	200,1	1,66
LDT537 (26)	16	49,48	16,2	50,1	1,01

7.2.8 Ensaio de toxicidade *in vivo*

Larvas da mariposa *Galleria Mellonella* têm sido amplamente usadas para estudar a virulência de patógenos como os fungos. Estas larvas são de fácil inoculação, bom custo-benefício e sem restrições éticas. O seu ciclo de vida completo tem duração de aproximadamente 6 semanas, sobrevivem em temperaturas de 37 °C, pesam entre 180-350 mg, apresentam 250-300 mm de comprimento e reproduzem bem os fatores de virulência. Adicionalmente, apresentam sistema imunológico funcional e estruturalmente semelhante ao sistema imunológico inato dos mamíferos (IGNASIAK e MAXWELL, 2017; SHEEHAN e KAVANAGH, 2018; SUAY-GARCÍA, et al., 2019).

Estudos sugerem o uso das larvas de *G. mellonella* como primeiro passo para a triagem de compostos antes dos testes em mamíferos. Para o estudo de patógenos fúngicos, este modelo tem apresentado bons resultados e bastante explorado nos ensaios *in vivo* para testar a eficácia de novos compostos antifúngicos (FIRACATIVA, et al., 2020; PIATEK, SHEEHAN e KAVANAGH, 2021).

O estudo da toxicidade *in vivo* é de extrema importância para compostos líderes com eficácia *in vitro*, pois indica possíveis limitações para seu uso em humanos. Habitualmente, estes testes são realizados em roedores, porém, este modelo experimental é longo, caro e relacionado a fatores éticos. A produção científica de alta qualidade está baseada no padrão dos 3Rs (do inglês: *Replacement, Reduction and Refinement*), ou seja, substituição, redução e refinamento com impacto na redução do uso de animais. Este estudo analisou a toxicidade em diferentes solventes para este modelo e identificou concentrações de até 30 % para os solventes DMSO, metanol e ácido acético (SUAY-GARCÍA, et al., 2019).

Ensaio em cultura de células podem aumentar a toxicidade de compostos químicos e é comum encontrar resultados diferentes em diferentes laboratórios, devido à diferença das linhagens utilizadas, métodos de preservação e cultura e número de passagem (ALLEGRA et al., 2018). Por isso análises *in vivo* no modelo de *G. mellonella* podem fornecer informações mais precisas das concentrações ideais. Este modelo ainda precisa de mais estudos, pois não possuem imunidade adaptativa

na forma de anticorpos, citocinas e células *natural killer*, o que dificulta a determinação da resposta imune dos mamíferos (PIATEK, SHEEHAN e KAVANAGH, 2021).

As larvas da mariposa da cera, *G. mellonella*, possuem sistema imunológico inato que é estruturalmente e funcionalmente aceitas como alternativa ética para a pesquisa. Allegra et al. (2018) avaliou a toxicidade de 30 compostos químicos em *G. mellonella* e identificou, que no geral, os estudos de cultura celular superestimam a toxicidade dos produtos químicos de baixa toxicidade, enquanto os resultados com as larvas apresentaram-se mais confiáveis. Ignasiak e Maxwell (2017), realizaram estudo comparativo da toxicidade em *G. mellonella* com a toxicidade em camundongos, e concluíram que pode ser usado para ensaios de infectividade e toxicidade. No estudo foram testados 11 compostos, injetados nas concentrações de 50 mg/Kg até 2.000 mg/Kg de peso corporal para atribuição da dose letal (DL₅₀). Para a maioria dos compostos, a toxicidade determinada correlacionou-se bem com a relatada nas FISPQ disponíveis para os compostos. Os experimentos demonstraram que as larvas de *Galleria* podem ser usadas em testes de toxicidade aguda, fornecendo correlação com a toxicidade em roedores.

Para os ensaios de citotoxicidade *in vivo*, em nenhum dos experimentos foi observada a morte das larvas nos grupos experimentais ou controle. Os compostos foram inicialmente dissolvidos em DMSO à concentração de 15 mg/mL. Posteriormente, essas soluções foram diluídas para 600 µg/mL em PBS contendo 10 % de DMSO.

As doses utilizadas para a citotoxicidade *in vivo* são cerca de dez vezes maiores que as concentrações aplicadas nos ensaios de sensibilidade fúngica, demonstrando segurança para o uso dos compostos, principalmente quando em sinergismo onde sua concentração é ainda menor.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

O uso do líquido da casca da castanha do caju no planejamento racional de novos ligantes compõem a funcionalização de uma matéria-prima renovável, de baixo custo e nativa do Brasil como uso estratégico, bioeconômico e sustentável para a obtenção de novos fármacos. Nesse estudo, por meio da hemissíntese, usando metodologias clássicas em química orgânica, bem como aprimoramento de métodos sintéticos, foram obtidos dois derivados-alvos (LDT536, **25** e LDT537, **26**) com atividade inibitória em histonas desacetilases humanas, atividade inibitória em biofilmes de *Candida* spp., *C. neoformans* e *S. brasiliensis*.

Os métodos empregados, forneceram 6 intermediários, com rendimentos que variaram de 60 % a 86 % e dois compostos finais em rendimentos de 36 % (**25**) e 48 % (**26**). Por meio do aprimoramento sintético, obteve-se uma economia atômica chegando aos compostos alvos em duas etapas, os compostos foram analisados por ressonância magnética nuclear.

Os compostos identificados como inibidores da enzima histona desacetilase, foram submetidos à avaliação da sensibilidade (CIM) para três fungos descritos como emergentes e associados a elevadas taxas de resistência, *Candida* spp., *C. neoformans* e *S. brasiliensis*. Os dois compostos apresentaram atividade fungistática, no entanto, o composto **26**, apresentou melhor perfil com CIM₅₀ entre 8- 32 µg/mL na maioria dos IC testadas. Logo, este foi submetido ao ensaio de sinergismo com antifúngicos clínicos, apresentando melhor atividade em *C. albicans*, em sinergismo com fluconazol, melhorando sua atividade em até 8 vezes.

Em face do exposto, o mesmo composto (**26**), foi submetido à análise de microscopia de varredura eletrônica frente a formação de biofilmes de *C. albicans*, apresentando redução na matriz do biofilme. Neste sentido, os dois compostos alvos foram submetidos ao teste de sensibilidade em células sésseis e avaliação da biomassa total. O composto **26**, apresentou melhor atividade para *C. albicans*, enquanto o composto **25** apresentou uma redução significativa da biomassa total para *C. tropicalis*.

O ensaio de sinergismo com o composto **25**, bem como, ensaios mais específicos, com isolados fúngicos mutantes compõem a perspectiva desta pesquisa para elucidar a ação destes inibidores em mecanismos de resistência, bem como, o seu uso em sinergismo para uma melhor resposta farmacocinética dos antifúngicos usuais.

O estudo das HDACs fúngicas é de extrema relevância para a compreensão dos mecanismos de defesa desses patógenos, além de representar alvo interessante para novas terapias. Por meio deste estudo foi possível planejar novos inibidores HDACs, a partir de compostos presentes em planta nativa do Brasil, capazes de potencializar a atividade de antifúngicos por meio do seu uso combinado, bem como constatar a potencialidade monoterápica em matrizes de biofilmes, fornecendo perspectivas para desvendar o papel de HDACs na patogênese e virulência de fungos. Os dois compostos apresentaram baixa citotoxicidade em células RAW264.7 e a toxicidade, *in vivo*, no modelo *G. mellonella*, não apresentou mortes na concentração de 600 µg/mL. Estes estudos preliminares, sugerem uma atividade relevante do LDT537 (**26**) principalmente para *C. albicans*, uma das espécies mais patogênica, e do LDT536 (**25**) para *C. tropicalis*, uma espécie emergente na América Latina com formação de isolados multirresistentes.

Dados enzimáticos de HDACs fúngicas purificadas e estudos com fungos mutantes (com HDACs deletadas) são essenciais para desvendar as funções e mecanismos de ação dos compostos propostos. Este estudo prévio identificou o composto LDT537 (**26**) como potente agente contra biofilmes de *C. albicans*, um dos fungos mais virulento relacionado a infecções nosocomiais. Apesar da sua toxicidade, seu uso, por meio de tecnologia de manipulação, pode ser expandido para desinfecção hospitalar.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIO, A.K.R., et al. Identification of a new antifungal compounds targeting thioredoxin reductase of *Paracoccidioides* genus. **Plos One**. v. 16, nov. 2015.

ACAR, C. et al. Synthesis and molecular docking studies of some novel antimicrobial benzamides. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, n. 103368, p. 103368, 2020.

ALLEGRA, E. et al. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469–472, 2018.

ALLSHIRE, R. C.; EKWALL, K. Epigenetic Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces pombe*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 7, p. a018770, 2015.

ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

ALVES-ZUZA, D., L., et al. *Candida tropicalis* geographic population structure maintenance and dispersion in the coastal environment may be influenced by the climatic season and anthropogenic action, **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 63-68, 2019.

AL-YASIRI, M. H. Opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* circulates between humans and yellow-legged gulls. **Scientific Reports**. v. 6, 2016.

AMES, L. et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1909–1917, 2017.

BANDALIZADEH, Z. et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility profiles of clinical *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 72–81, 2020.

BANNISTER, A., KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**. v. 21, p. 381-395, 2011.

BAR-YOSEF, H., et al., Chemical inhibitors of *Candida albicans* hyphal morphogenesis target endocytosis. **Sciences Reports**. v. 7, 2017.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319–331, 2020.

BERMAS, A.; GEDDES-MCALISTER, J. Combat ting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721–734, 2020.

BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research.**, v. 8, n. 3, p. 442–450, 2008.

BONATO-CAPOTE, F., et al. In vitro interaction of *Candida tropicalis* biofilm formed on catheter with human cells, **Microbial Pathogenesis**. v. 125, p. 177-182, 2018.

BONGOMIN, FELIX et al. “Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases- Estimate Precision.” **Journal of Fungi**. v. 3, n. 4, 2017.

BORBA-SANTOS, L. P. et al. Anti *Sporothrix* activity of ibuprofen combined with antifungal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 101–106, 2021.

BOUZ, G.; DOLEŽAL, M. Advances in antifungal drug development: An up-to-date mini review. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 12, p. 1312, 2021.

BRAGA, F. C. et al. Synthesis of cardanol-based 1,2,3-triazoles as potential green agents against neoplastic cells. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 20, n. 100408, p. 100408, 2021.

BRANDÃO, F. A. S., et al. Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. **Virulence**. v. 6, n.6, p. 618-630, 2015.

BRILHANTE R. S., et al. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources show similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Microbiology**. v.192, p. 213-219, 2016.

BRILHANTE R. S., et al. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiology**. v.13, n.10, p. 1129-1140. 2018. doi:10.2217/fmb-2018-0070.

BRUNKE, S. et al. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current opinion in microbiology**, v. 32, p. 89–95, 2016.

BUSCAINO, A. Chromatin-mediated regulation of genome plasticity in human fungal pathogens. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 855, 2019.

CAI, Z., et al. Design, synthesis, and SAR study of 3-(benzo[d][1,3] dioxol-5-yl)-N-benzyl propanamide as novel potent synergists against fluconazole-resistant *Candida albicans*, **Bioorganic E Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, n. 19, 2017.

CARVALHO, R., R., et al. Promising synergistic activity of fluconazole with bioactive Guttiferone-A and derivatives against non-albicans *Candida* species, **Journal De Mycologie Médicale**. v. 28, n. 4, p. 645-650, 2018.

CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 130–132, 2007.

CAVALLI, G. and HEARD, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**. v. 571, p. 489-499., 2019.

CERONE, M. et al. Discovery of sustainable drugs for neglected tropical diseases: Cashew nutshell liquid (CNSL)-based hybrids target mitochondrial function and ATP production in *Trypanosoma brucei*. **ChemMedChem**, v. 14, n. 6, p. 621–635, 2019.

CIUREA, C. N. et al. *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.

CHAKRABARTI, A., and SETHURAMAN, N. Introduction to Medical Mycology. **Current Progress in Medical Mycology**, p. 1–27, 2017.

CHAND, P. et al. Synergism of zinc oxide quantum dots with antifungal drugs: Potential approach for combination therapy against drug resistant *Candida albicans*. **Frontiers In Nanotechnology**, v. 3, 2021.

CHANG, Z. et al., Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, 2019.

CHARLET, R., et al. Remodeling of the *Candida glabrata* cell wall in the gastrointestinal tract affects the gut microbiota and the immune response. **Scientific Reports**. v. 8, 2018.

CHATZIMOSCHOU A, et al. Activities of triazole-echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. **Antimicrobial Agents Chemother**. v. 55, p. 1968–1974. 2011.

CHOI, M.A., PARK, S.Y., et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of CNS penetrant HDAC inhibitors structurally derived from amyloid- β probes. **Scientific Reports**. v. 9, n. 13187, 2019.

CHUDZIK, B. et al., Synergistic antifungal interactions of amphotericin B with 4-(5-methyl 1,3,4-thiadiazole-2-yl) benzene-1,3-diol. **Scientific Reports**. v. 9, n. 12945, 2019.

CLSI. 2008a. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Approved Standard - Third Edition. **CLSI document M27A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.

CLSI. 2008b. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*; Approved Standard - Second Edition. **CLSI document M38A2**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard - Second Edition*. **M27-A3** ed. (CLSI, ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COCHRAN, B. M. One-Pot Oxidative Cleavage of Olefins to Synthesize Carboxylic Acids by a Telescoped Ozonolysis-Oxidation Process. **Synlett**. v.27, p. 245-248, 2016.

CORREIA, I., et al. Role of *Candida albicans* mating in genetic variability and adaptation to the host. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, p. 180-189, 2019.

COSTA, C. et al. *Candida glabrata* drug:H⁺ antiporter CgTpo3 (ORFCAGL010384g): role in azole drug resistance and polyamine homeostasis, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 176-1776, 2014.

COSTA, R. S., et al. The multidrug resistance transporters CgTpo1_1 and CgTpo1_2 plays a role in virulence and biofilm formation in the human pathogen *Candida glabrata*. **Cellular Microbiology**. v. 19, 2017.

DABAS, Y. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of invasive fungal infections (IFIs) in India: A prospective observational study. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 1, p. 33, 2021.

DANTAS, A. S., et al., Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v. 34, p. 111-118, 2016.

DE ANDRADE R. G. et al. Discovery of sustainable drugs for Alzheimer's disease: cardanol-derived cholinesterase inhibitors with antioxidant and anti-amyloid properties. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1154–1163, 2021.

DE OLIVEIRA BENTO, A. et al. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **Plos Neglected Tropical Diseases**, V. 15, n. 8, p. e0009693, 2021.

DE SOUZA, E. W. et al. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

DEBERALDINI, M. G.; SANTOS, J. L. Infecções Fúngicas Invasivas: Aspectos Gerais e Tratamento. **Ulakes Journal of Medicine**, v. 1, n. 3, p. 209–221, 2021.

DELARZE, E. and SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance.**, v. 23, p. 12-19, 2015.

DIBA, K., et al., Emerging *Candida* species isolated from renal transplant recipients: Species distribution and susceptibility profiles. **Microbial Pathogenesis.** v. 125, p. 240-245, 2018.

DRA, A. et al. Antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID European committee for antimicrobial susceptibility testing. Disponível em: <<http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2020/03/TSA-fungos-filamentosos-E.Def-9.3.1.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2022.

EKWALL, K. Genome-wide analysis of HDAC function. **Trends In Genetics: TIG**, v. 21, n. 11, p. 608–615, 2005.

ELIZABETH A. S., HORATIO B. F., HAROLD L. K. Caspofungin: An echinocandin antifungal agent, **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 351-377, 2002.

FIRACATIVE, C. et al. Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. **Journal Of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 3, p. 130, 2020.

FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200430, 2020.

FUCHS, S., M., and QUASEM, I. Budding yeast as model to study epigenetics. **Drug Discovery Today: Disease Models.** v. 12, p. 1-6, 2014.

FYODOROV, D., V. et al. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v.19, p.192–206, 2018.

GÁCIA-PEREZ, L. A., et al. *Candida* and candidiasis. **Current Progress in Medical Mycology.** p. 91–118, 2017.

GAFFI.org <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/> acesso: 31-10-2020 (14:22h).

GARCIA, L. G. S. et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosan against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 341–348, 2020.

GARNAUD, C. et al., Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species. **Frontiers In Microbiology.** v. 7, 2016.

GEDIYA, L., K. et al. A New Simple and High-Yield Synthesis of Suberoylanilide Hydroxamic Acid and Its Inhibitory Effect Alone or in Combination with Retinoids on Proliferation of Human Prostate Cancer Cells. **Journal Of Medicinal Chemistry**. v.48, n.15, p. 5047-5505, 2005.

GELETNEKY, C., & BERGER, S. The Mechanism of Ozonolysis Revisited by ¹⁷O-NMR Spectroscopy. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 8, p. 1625–1627, 1998.

GHIRLANDO, R., and FELSENFELD, G. “Chromatin structure outside and inside the nucleus.” **Biopolymers**. v. 99, n. 4, 2013.

GIACOMAZZI, J., BAETHGEN, L., et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**. V.59, p. 145-150., 2016.

GIOLO, M. e SVIDZINSKI, T. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Journal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial**. v. 46, n.3, 2010.

GIZIŃSKA, M., et al. Novel sulfones with antifungal properties: Antifungal activities and interactions with candida spp. Virulence factors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 12–21, 2019.

GONG, Y., et al. “*Candida albicans* Heat Shock Proteins and Hsps-Associated Signaling Pathways as Potential Antifungal Targets.” **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**. v. 7, n.520, 2017.

GOW, N. A. R., et al., *Candida albicans* morphogenesis and host defense: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, n.2, p. 112-122., 2011.

GERMIÃO, I. D. F. et al. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621–624, 2020.

GUCWA, K. et al. Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. **Pathogens**. v. 7, n. 56, 2018.

HADRICH, I. and AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility. **Journal De Mycologie Medicale**., v. 28, p. 574-584, 2018.

HEARD, S. C.; WU, G.; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 232–241, 2021.

HELENA H., LOBO B. et al., Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**. v. 61, n. 10, p.754-763, 2018.

HRABETA, J., et al., Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** v. 158, n.2, p.161–169, 2014.

HSU, K., LIU, C., LIN, T.E. et al. Novel Class IIa-Selective Histone Deacetylase Inhibitors Discovered Using *anin Silico* Virtual Screening Approach. **Scientific Reports.** v. 7, 2017.

HUA-YUAN, W. et al. The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 26, n. 13, 2016.

IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes,** v. 10, n. 1, 2017.

IKEDA, M. A. K. et al. Extra cellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. **Frontiers In Microbiology,** v. 9, p. 2286, 2018.

IYER, K. R. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology,** v. 19, n. 7, p. 454–466, 2021.

JAMES-ARMSTRONG, D. et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **Lancet Infect Diseases.** v. 17, p. 393-402, 2017.

JANBON, G., et al. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. **Genes & Immunity.** v.20, n. 5., p. 403-414, 2019.

JENULL, S., et al. "The *Candida albicans* HIR histone chaperone regulates the yeast-to-hyphae transition by controlling the sensitivity to morphogenesis signals." **Scientific Reports.** v. 7, n.1, 2017.

KANE, A. et al. The antifungal and synergistic effect of bisphosphonates in *Cryptococcus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 65, n. 2, 2021.

KASPER, L. et al. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. **FEMS Yeast Research.** v. 15, n. 5, 2015.

KATHIRAVAN, M. K., et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic E Medicinal Chemistry.** v. 20, p. 5678-5698, 2012.

KELLERMAYER, R. Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases. **Canadian Journal of Gastroenterology And Hepatology.** v. 26, n. 12, p. 909-915. 2012.

KHAN, S. N. e KHAN, A. U. Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update. **Clinica Chimica Acta**. v. 411, p. 1401-1411, 2010.

KMETZSCH, L. Histone deacetylases: Targets for antifungal drug development. **Virulence**. p. 535-536. 2015.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function, **Cell**. v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KUCHELER, K., et al. Fungal KATs/KDACs: A New Highway to Better Antifungal Drugs? **Plos Pathogens**. v. 12, n. 11, 2016.

KULLBERG, B. J. e ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**. v. 373, p. 1445–1456, 2015.

LAZIC, J., et al. Bis-guanyl hydrazones as efficient anti-Candida compounds through DNA interaction. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.102, n. 4, p. 1889-1901, 2018.

LEMES, L. F. N. et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687–700, 2016.

LEE, D. J. et al. Glyco biology of human fungal pathogens: New avenues for drug development. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 11, p. 1348, 2019.

LEE, J., E., et al. Ssn6 has dual roles in *Candida albicans* filament development through the interaction with Rpd31. **FEBS Letters**. v. 589, n.4, 2015.

LEGRAND, M., et al., *Candida albicans*: An Emerging Yeast Model to Study Eukaryotic Genome Plasticity. **Trends In Genetics**. v. 35, n. 4, 2019.

LI, C. et al. Heat shock protein 90 (Hsp90)/Histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for the treatment of azoles-resistant *Candida albicans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 227, n. 113961, p. 113961, 2022.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**. v. 3, p. 662–673, 2002.

LI, X. et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 1993–2003, 2015.

LI, X. et al. Histone deacetylase inhibitor attenuates experimental fungal keratitis in mice. **Scientific Reports**. v. 9, n. 9859, 2019.

LI, Y., et al. Fungal acetylome comparative analysis identifies an essential role of acetylation in human fungal pathogen virulence. **Communications Biology**, 2019.

LI, Z. et al. Novel carboline fungal histone deacetylase (HDAC) inhibitors for combination maltreatment azole-resistant candidiasis. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 1116–1126, 2021.

LINCIANO, P. et al. Investigation of the effect of different linker chemotic person the inhibition of histone deacetylases (HDACs). **Bioorganic Chemistry**, v. 106, n. 104462, p. 104462, 2021.

LIU, N. et al. Emerging new targets for the treatment of resistant fungal infections. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 5484–5511, 2018.

LIU, W., et al., Clinical characteristics of *Candida tropicalis* fungaemia with reduced triazole susceptibility in Taiwan: a multi-center study. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 53, p. 185-189.

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018.

LOMBARDI, P. M et al. “Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes.” **Current Opinion In Structural Biology**, v. 21, n. 6, 2011.

LOPES, R.G.P.L. Efeito *in vitro* da proteinase K na matriz do biofilme de fungos dermatofíticos: uma análise das interações com terbinafina e griseofulvina. **Dissertação (mestrado) – UFC**. 2022.

LOZOYA-PÉREZ, N. E. et al. Influences of the Culturing Media in the Virulence and Cell Wall of *Sporothrix chenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. **Journal Of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, p. 323, 2020.

LU, C. E THOMPSON, C., B., Metabolic regulation of epigenetics. **Cell Metabolism**. v. 16, n. 1, p. 9-17, 2012.

LU, M. et al. Nucleosome Positioning with Fractal Entropy Increment of Diversity in Telemedicine. **IEEE**. v. 6, 2017.

LU, Y., SU, C. e LIU, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. **Trends In Microbiology**. v. 22, n. 12, p. 707-714, 2014.

LUAN, et al., Chapter 14 - Histone Acetyltransferases: Enzymes, Assays, and Inhibitors. **Epigenetic Technological Applications**, p. 291-317, 2015.

MAHATA, D. et al. Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 5–11, 2014.

MAI, A. et al. Discovery of uracil-based histone deacetylase inhibitors able to reduce acquired antifungal resistance and trailing growth in *Candida albicans*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**. v. 17, n.5, 2017.

MANAL, M. et al. Inhibitor of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. **Bioorganic chemistry**. v. 67, p. 18-42, 2016.

MASCHIO-LIMA, T. et al. Clinical and epidemiological aspects of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and in vitro antifungal susceptibility. **Veterinary Research Communications**, v. 45, n. 4, p. 171–179, 2021.

MAYER, F. L.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus neoformans*. **Trends In Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 163–164, 2020.

MAZZETTO, S. E.; et al. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.

MEREK, B., CHORY, J. Structural and chemical biology of deacetylases for carbohydrates, proteins, small molecules and histones. **Communications Biology**. v. 1, n. 217, 2018.

Micoteca. Disponível em: <<https://www.cemm-ufc.org/micoteca>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

MILAZZO, G. et al. Histone deacetylases (HDACs): Evolution, specificity, role in transcriptional complexes, and pharmacological actionability. **Genes**, v. 11, n. 5, p. 556, 2020.

MORAIS, J. A. V. et al. Photodynamic therapy inhibits cell growth and enhances the histone deacetylase-mediated viability impairment in *Cryptococcus* spp. in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, n. 101583, p. 101583, 2020.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**. v. 65, p. 55–63, 1983.

MOTTAMAL, M. et al. “Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents.” **Molecules (Basel, Switzerland)**. v. 20, n. 3 p.3898-941, 2015.

MUSSELMAN, C. A. Chromatin and epigenetic signaling pathways. **Chromatin Signaling and Neurological Disorders**, p. 1–23, 2019.

NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**. v. 10, n. 4, 2017.

NESTLER, EJ. Transgenerational Epigenetic Contributions to Stress Responses: Fact or Fiction? **Plos Biology**. v.14, n. 3, 2016.

NETEA, M. G., et al. Immune defense against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**. v. 15, n. 10, p. 630-642, 2015.

NOBLE, S. M., *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**. v. 15, p. 96–108, 2017.

O'KANE, C. J.; HYLAND, E. M. Yeast epigenetics: the inheritance of histone modification states. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 5, 2019.

ODDS FC. Synergy, antagonism, and what the *chequerboard* puts between them. **J Antimicrobe Chemother**.v. 52, 2003.

OH, J. et al., A universal TagModule collection for parallel genetic analysis of microorganisms. **Nucleic Acids Research**. v. 38, 2010.

P. DE J. PEREIRA, J. et al. An innovative and accessible chemical approach to bisphenol identification on plastic surfaces. **Revista Virtual De Química**, v. 13, n. 1, p. 234–241, 2021.

PAIVA, M. T. et al. Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 183, n. 105125, p. 105125, 2020.

PAPPAS, P. et al., Invasive candidiasis. **Nature Reviews Primers**. v. 4, 2018.

PARK, S.-Y.; KIM, J.-S. A short guide to histone deacetylases in cluding recent progress on class II enzymes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 204–212, 2020.

PAUL-SATYASEELA, Maneesh et al. “Novel hydroxamates potentiated *in vitro* activity of fluconazole against *Candida albicans*.” **Journal Of Natural Science, Biology, And Medicine** v. 8, n.1, p. 119-124, 2017.

PERINE, H. F., et al., Phenotypic switching in *Candida tropicalis* alters host-pathogen interactions in a *Galleria mellonella* infection model. **Sciences Reports**. v. 9, 2019.

PERLIN, S. D., et al. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect Diseases**. v. 17, 2017.

PERLLIN, D. S., SHOR, E., ZHAO, Y. Update on antifungal drug resistance. **Current Clinical Microbiology Reports**. v. 2, p. 84-95, 2015.

PETER T. R., et al. Advances in Label-Free Screening Approaches for Studying Histone Acetyltransferases, **SAGE Journals**, 2011.

PFALLER MA, et al. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n.12, p. 3797-804, 2009.

PIATEK, M.; SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. *Galleria mellonella*: The versatile host for drug discovery, in vivo toxicity testing and characterizing host-pathogen interactions. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 12, p. 1545, 2021.

PRISTOV, K. E., e GHANNOUM, M., A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 25, p. 792-798, 2019.

PULYA, S. et al. HDAC6 as privileged target in drug discovery: A perspective. **Pharmacological Research: The Official Journal of The Italian Pharmacological Society**, v. 163, n. 105274, p. 105274, 2021.

QIU, X. et al. From natural products to HDAC inhibitors: An overview of drug discovery and design strategy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 116510, p. 116510, 2021.

QUINA, A. S., BUSCHBECK, M., DI CROCE, L. Chromatin structure and epigenetics. **Biochemical Pharmacology**. v. 72, n.11, 2006.

RAJASEKHARAN, S., et al., Species-specific detection of *Candida tropicalis* using evolutionary conserved intein DNA sequences. **Letters In Applied Microbiology**, v. 66, p. 378-383, 2018.

RANJAN, K. et al. The role of *Cryptococcus neoformans* histone deacetylase genes in the response to antifungal drugs, epigenetic modulators and to photodynamic therapy mediated by an aluminium phthalocyanine chloride nanoemulsion in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 216, n. 112131, p. 112131, 2021.

RODRIGUES, C. F., et al., *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 33, n. 5, p. 673–688, 2013.

RODRIGUEZ, T. J. L. e DENNING, D. W., Recovery from serious fungal infections should be realisable for everyone. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 17, n.11, p. 1111-1113, 2017.

RODRIGUES, M.L., ALBUQUERQUE, P. C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 12, n. 6, 2018.

ROMEIRO, L. A. S., et al. Novel Sustainable-by-Design HDAC Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Medicinal Chemistry Letters**. v. 10, n. 4, p. 671-676, 2019.

ROSSATO, L. et al. The impact of the absence of Toll-like receptor-2 during *Sporothrix brasiliensis* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 87–94, 2019.

ROSSI, M. et al. Sustainable drug discovery of multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 8, p. 4972–4990, 2021.

ROSSOW, J. A. et al. A One Health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in south America. **Journal Of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020.

SADEGHI, G., et al., Emergence of non-Candida albicans species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile, **Journal De Mycologie Médicale**. v. 28, n. 1, p. 51-58, 2018.

SAHIN, C. et al. Phenolic lipids derived from cashew nut shell liquid to treat metabolic diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. acs.jmedchem.1c01542, 2022.

SALARI, S. Evaluation of biofilm formation ability in different Candida strains and anti-biofilm effects of Fe₃O₄-NPs compared with Fluconazole: an in vitro study. **Journal of Mycologie Medicale**, v. 28., p. 23-28, 2018.

SALVADOR, L., A, and LUESCH, H. "Discovery and mechanism of natural products as modulators of histone acetylation." **Current Drug Targets**, v. 13, n.8, p.1029-47. 2017.

SANGUINETTI, M., POSTERARO, B. and LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p.2-13, 2015.

SARDI, J., C., O., et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp., **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 86, n.4., 2016.

SAVERIO, M. and GIUSEPPE, P., P. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 38–51, 2006.

SCADUTO, C. M., et al., Epigenetic control of pheromone MAPK signaling determines sexual fecundity in *Candida albicans*. **PNAS**, v. 114, n. 52, p. 1378-1385, 2017.

SCHAEFER, S. et al. Rational design of an antifungal polyacryl amide library with reduced host-cell toxicity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 23, p. 27430–27444, 2021.

SCHNEIDER, A., et al. “Acetyltransferases (HATs) as targets for neurological therapeutics.” **Neuro Therapeutics**, v. 10, n. 4, 2013.

SCOTT G. VAN O., CHAMPEAU R. M., and PARIZA, P; Ozonolysis Applications in Drug Synthesis. **Chemical Reviews**, v.106, p. 2990-3001, 2006.

SEAGLE, E. E.; WILLIAMS, S. L.; CHILLER, T. M. Recent trends in the epidemiology of fungal infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 237–260, 2021.

SEILER, G. T.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Investigation agents for the treatment of resistant yeasts and molds. **Current Fungal Infection Reports**, v. 15, n. 3, p. 1–12, 2021.

SERAFINI, M. R. et al. A patent review of antibiofilm fungal drugs (2002-present). **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 229–248, 2021.

SETO, E., and YOSHIDA. M. “Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes.” **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 6, n. 4, 2014.

SHAFQAT A. K., REDDY, D., SANJAY G. Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment? **World Journal of Biological Chemistry**. v.6, n.4, p.333-345, 2015.

SHAKESPEAR, M., R., et al. Lysine Deacetylases and Regulated Glycolysis in Macrophages. **Immunometabolism**. v. 39, n.6, p. 473-488, 2018.

SHARMA, S.; AHMED, M.; AKHTER, Y. Fungal acetyltransferases structures, mechanisms and inhibitors: A review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 626–640, 2020.

SHAWN, R., et al., Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**. v. 64, n. 2, p. 134-140, 2017.

SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 163–172, 2018.

SHIVARATHRI, R., et al. "The Fungal Histone Acetyl Transferase Gcn5 Controls Virulence of the Human Pathogen *Candida albicans* through Multiple Pathways." **Scientific Reports**. v. 9, 2019.

SILVA, R. O. et al. Synthesis and structure-activity relationships of novel arylpiperazines as potent antagonists of α 1-adrenoceptor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 601–610, 2016.

SKVORTSOVA, K. et al., Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 19, p. 774-790, 2018.

SMITH, W. L.; EDLIND, T. D. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: Correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3532–3539, 2002.

SOUZA, N. DE O. et al. Cashew nut shell liquids: Antimicrobial compounds in prevention and control of the oral biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 133, n. 105299, p. 105299, 2022.

SPAMPINATO, C. e LEONARDI, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**. 2013.

SPEYBROECK, L. V. From Epigenesis to Epigenetics. **Annals Of The New York Academy of Sciences**. v. 981, p. 61-81, 2002.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169–185, 2017.

SU, H., HAN, L., & HUANG, X. Potential targets for the development of new antifungal drugs. **The Journal of Antibiotics**, 2018.

SU, M.; GONG, X.; LIU, F. An update on the emerging approaches for histone deacetylase (HDAC) inhibitor drug discovery and future perspectives. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 745–761, 2021.

SUAY-GARCÍA, B. et al. New solvent options for in vivo assays in the *Galleria mellonella* larvae model. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 776–782, 2019.

SUN, W. et al., Strong synergism of dexamethasone in combination with fluconazole against resistant *Candida albicans* mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 50, n.3, p. 399-405, 2017.

TALAPKO, J. et al. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAN, L. et al. In vitro synergistic effect of minocycline combined with antifungals against *Cryptococcus neoformans*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 32, n. 1, p. 101227, 2021.

TEODORO, G. R., et al. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. **Frontiers Microbiology**., 2015.

THABISO, E., et al., Genome-wide functional analysis in *Candida albicans*. **Virulence**. v. 8, p. 1563-1579, 2017.

THYAGARAJAN, R. V.; MONDY, K. E.; ROSE, D. T. *Cryptococcus neoformans* blood stream infection in severe COVID-19 pneumonia. **IDCases**, v. 26, n. e01274, p. e01274, 2021.

TONG, Y. et al. Hyper-synergistic antifungal activity of rapamycin and peptide-like compounds against *Candida albicans* orthogonally via Tor1 kinase. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 2826–2835, 2021.

TREVINO-RANGEL, et al., Phenotypical characterization and molecular identification of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Revista Ibero Americana De Micología**.v. 35, n. 1, p. 17-21. 2018.

TROJER, P. and REINBERG, D. Histone Lysine Demethylases and their impact on epigenetics. **Cell**. v. 125, n. 2, p.213-217, 2006.

TSAI, M., et al., Candidemia due to uncommon *Candida* species in children: new threat and impacts on outcomes. **Scientific Reports**. v. 8, 2018.

TSCHERNER, M., and KARL K. "A Histone Acetyltransferase Inhibitor with Antifungal Activity against CTG clade *Candida* Species." **Microorganisms**, v. 7, n.7, 2019.

TUITE, A.; MULLICK, A. e GROS, P. Genetic analysis of innate immunity in resistance do *Candida albicans*. **Genes and Immunity**. v. 5, p; 576-587, 2004.

TYMAN, H. P. et al., Ozonization of phenols from *Anacardium occidentale* (cashew). **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 79, n. 7, p. 725-732.

ULIASSI, E. et al. Cashewnutshellliquid (CNSL) as a source of drugs for Alzheimer's disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 18, p. 5441, 2021.

VANDER M., KAREN M et al. "Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma." **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n.8, p. 525-31, 2011.

VILALOBOS-ELIAS, A. et al., Chromatin modification factors in plant pathogenic fungi: Insights from *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics And Biology**. v. 129, p. 52-64, 2019.

VILLALOBOS-ESCOBEDO, J. M. Alfredo Herrera-Estrella & Nohemí Carreras-Villaseñor. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi, **Mycologia**. v. 108, n.3, p. 556-571, 2016.

WALLER, S. B. et al. Jabuticaba [*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts]: a Brazilian fruit with a promising application against itraconazole-susceptible and -resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 5988–5992, 2021.

WATANABE, N., et al. E1210, a new broad-spectrum antifungal, suppresses *Candida albicans* hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 960-971, 2011.

WHALEY, S. G., et al., Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, 2017.

WHIBLEY, N. and GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanism of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**. v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

WOODCOCK, C. L., and GHOSH, R. P. “Chromatin higher-order structure and dynamics.” **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 2, n. 5, 2010.

WU, M.-Y., & YU, J.-H. Epigenetics of Fungal Secondary Metabolism Related Genes. **Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites**, v. 2, p. 29–42, 2015.

XHEMALCE, B., DAWSON, M.A., BANNISTER, A.J. Histone modifications. In: Meyers R, ed. **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**. 2011.

XIAOFANG, Li, et al., The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 70, 2015.

XIE, J. et al. “The Paralogous Histone Deacetylases Rpd3 and Rpd31 Play Opposing Roles in Regulating the White-Opaque Switch in the Fungal Pathogen *Candida albicans*.” **mBio**. v.7, n.6, 2016.

XU, S. et al., One-pot reductive cleavage of exo-olefin to methylene with a mild ozonolysis-Clemmensen reduction sequence. **Tetrahedron Letters**. v. 51, n. 34. p. 4534-4537, 2010.

YANG, J. et a., In vitro synergy of azole antifungals and methotrexate against *Candida albicans*. **Life Sciences**. v. 235, 2019.

YANG, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel hydroxamic acid-based histone deacetylase 6 selective inhibitors bearing phenylpyrazol scaffold as

surface recognition motif. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1418–1425, 2018.

YANG, J., et al. In vitro synergy of azole antifungals and methotrexate against *Candida albicans*, **Life Sciences**. v. 235, 2019.

YANG, X.-J., & SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.3, p. 206–218, 2008.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v. 10, p. 95-105. 2014.

YOSHIDA, M., KUDO, N., et al. Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases. **Biological Sciences**. v. 93, n. 5, p. 297-321, 2017.

ZAFAR, H. et al. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 158–164, 2019.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

ZHANG L, XU W. Histone deacetylase inhibitors for enhancing activity of antifungal agent: A patent evaluation of WO2014041424(A1).

ZHANG, M., et al. Antifungal activity of ribavirin used alone or in combination with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by reducing virulence, **International Journal of Antimicrobial Agents**. 19, 2019.

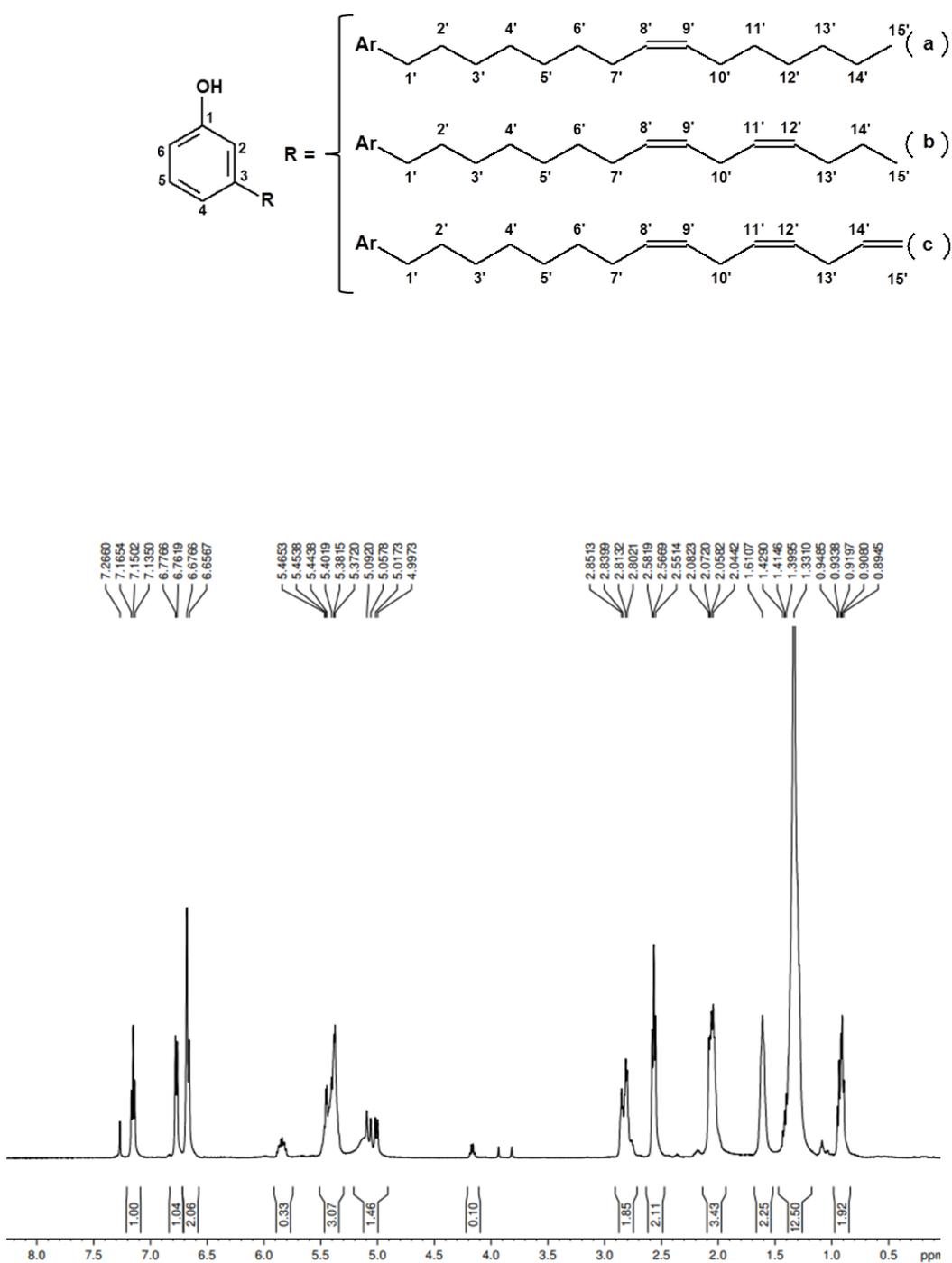
ZHANG, X.-H. et al. A review of progress in histone deacetylase 6 inhibitors research: Structural specificity and functional diversity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 1362–1391, 2021.

ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics In Infectious Diseases**, v. 89, n. 104731, p. 104731, 2021.

ZHU, T. et al. Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for treatment of *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* infections. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 221, n. 113524, p. 113524, 2021.

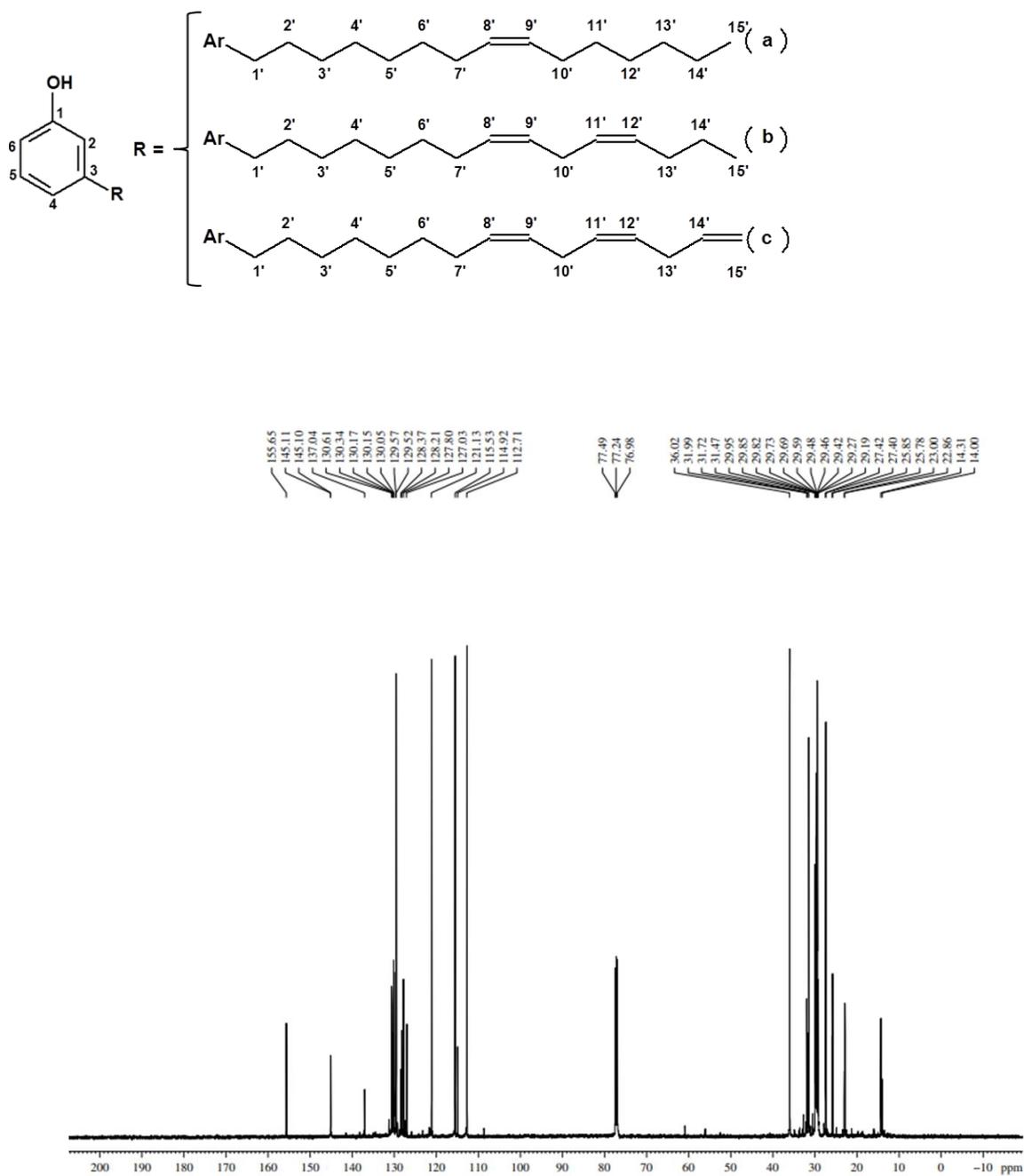
ANEXO 01

LDT10i

Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)

ANEXO 02

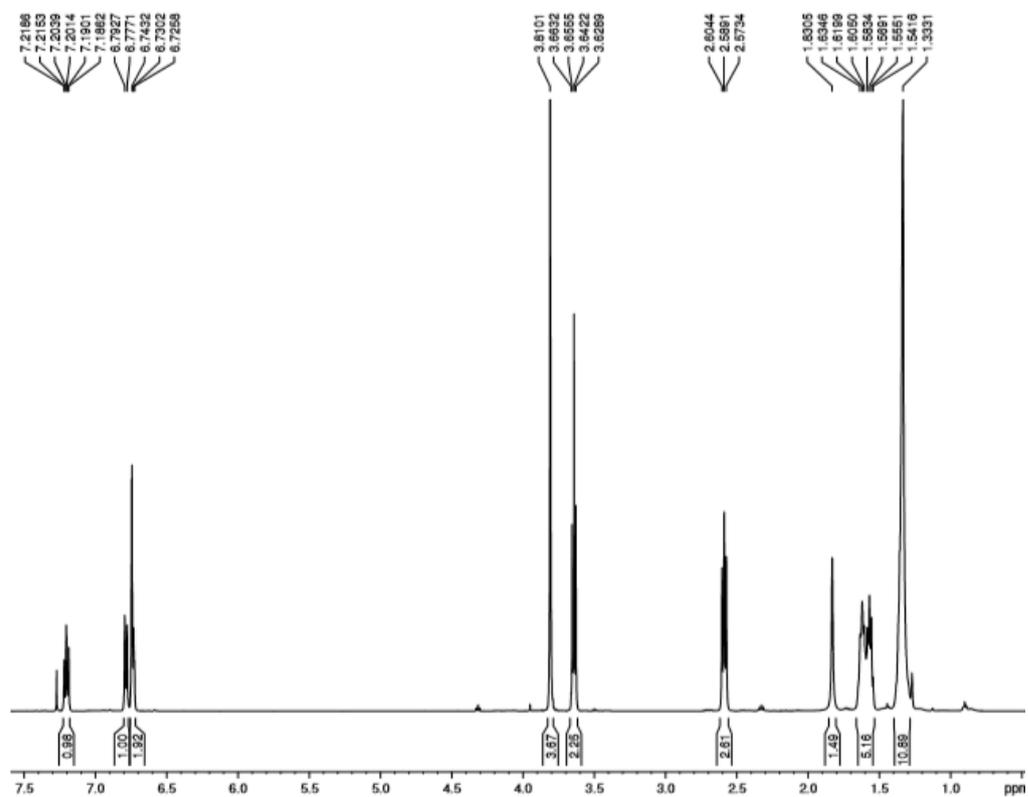
LDT10i

Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

ANEXO 03

LDT72

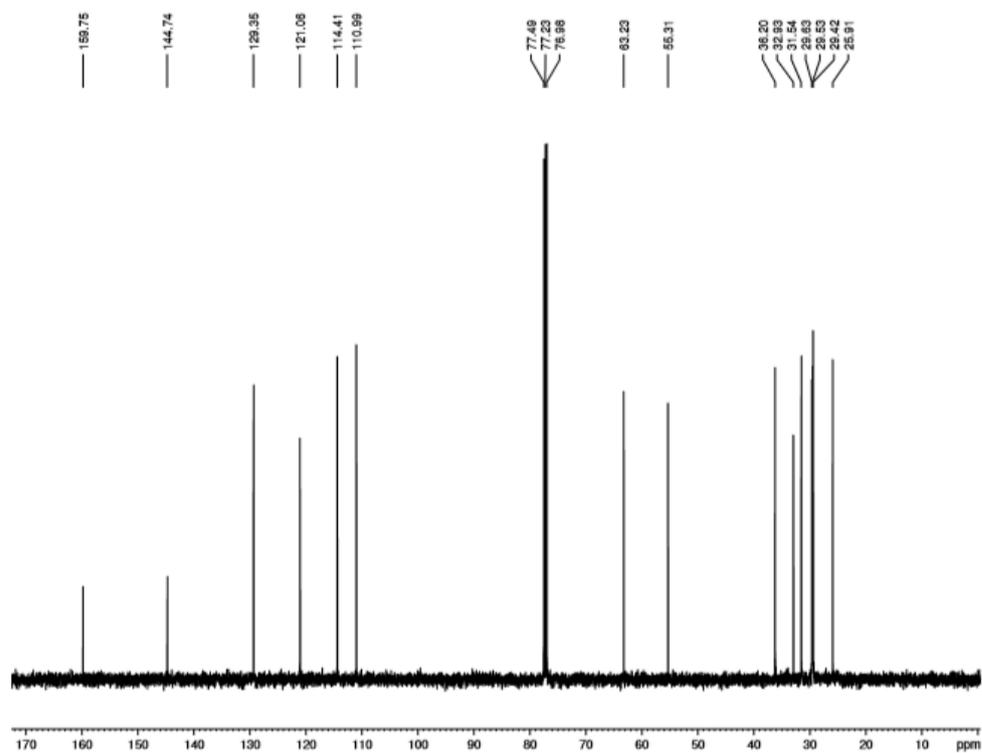
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)



ANEXO 04

LDT72

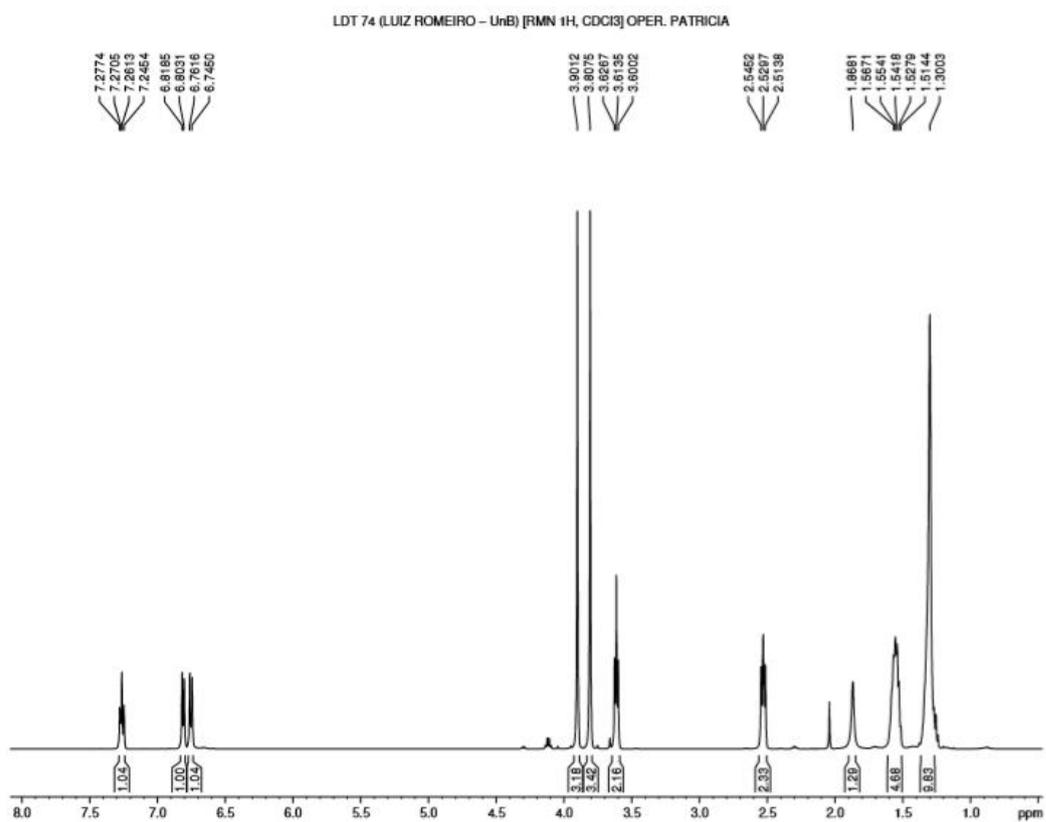
Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)



ANEXO 05

LDT74

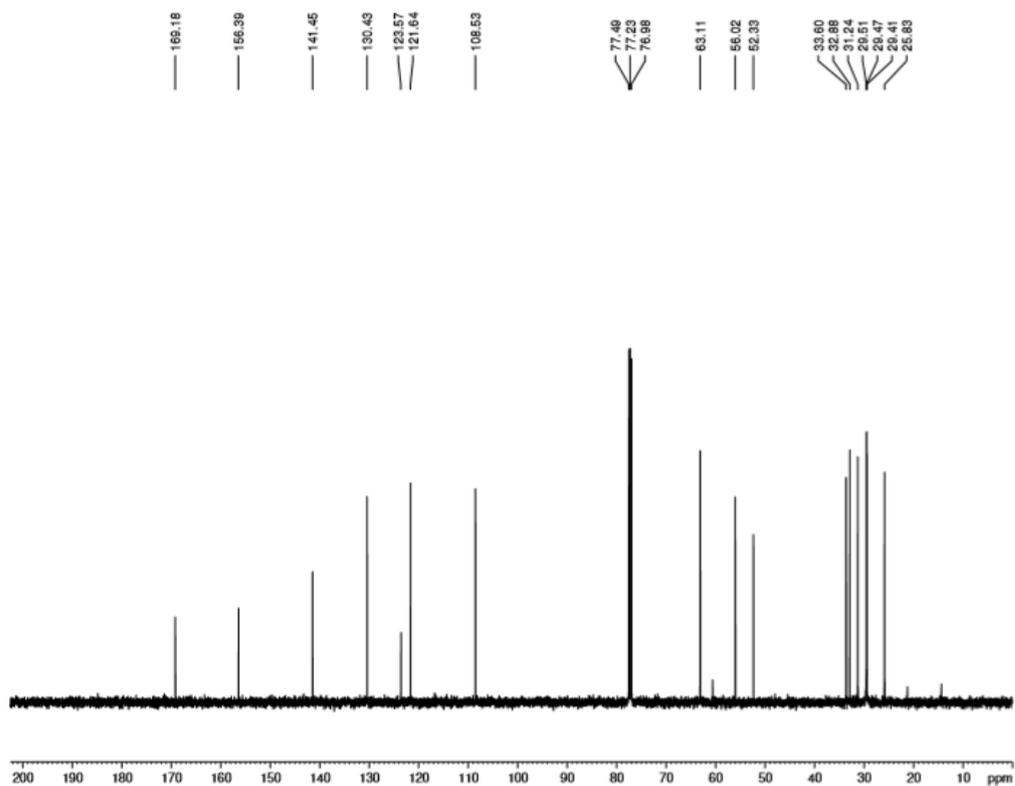
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)



ANEXO 06

LDT74

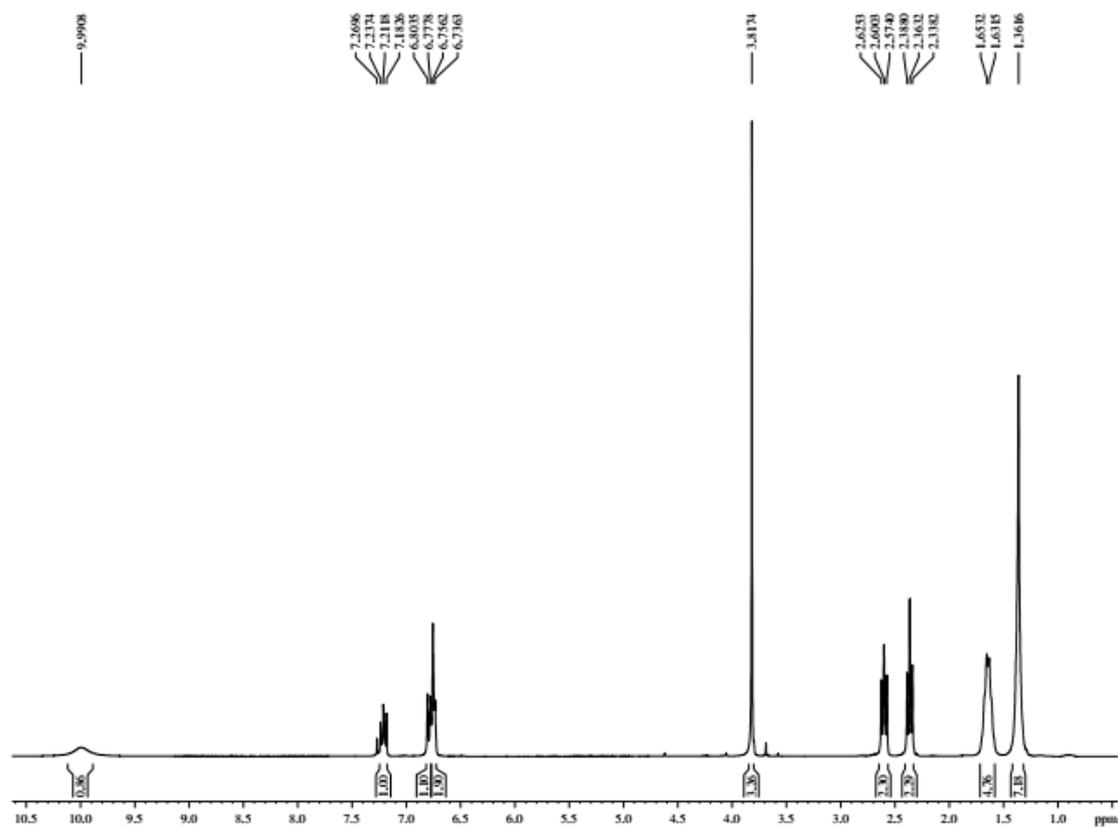
Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)



ANEXO 07

LDT80

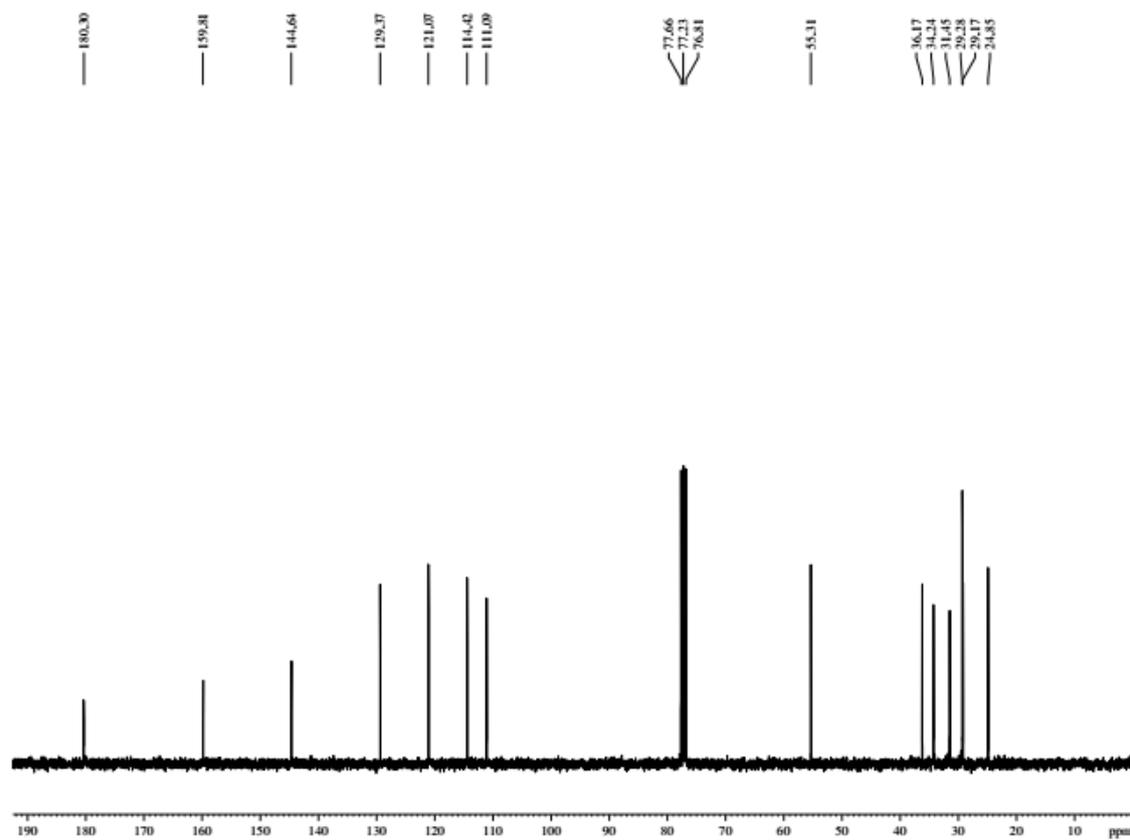
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)



ANEXO 09

LDT80

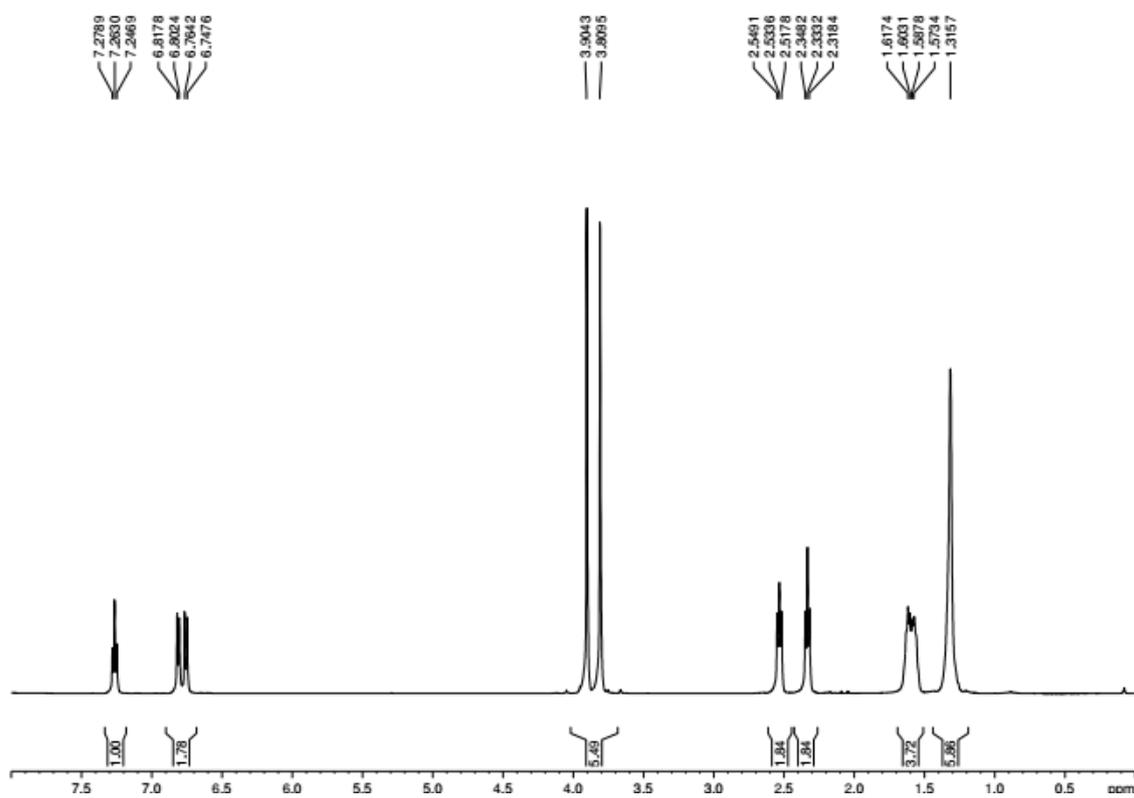
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)



ANEXO 10

LDT394

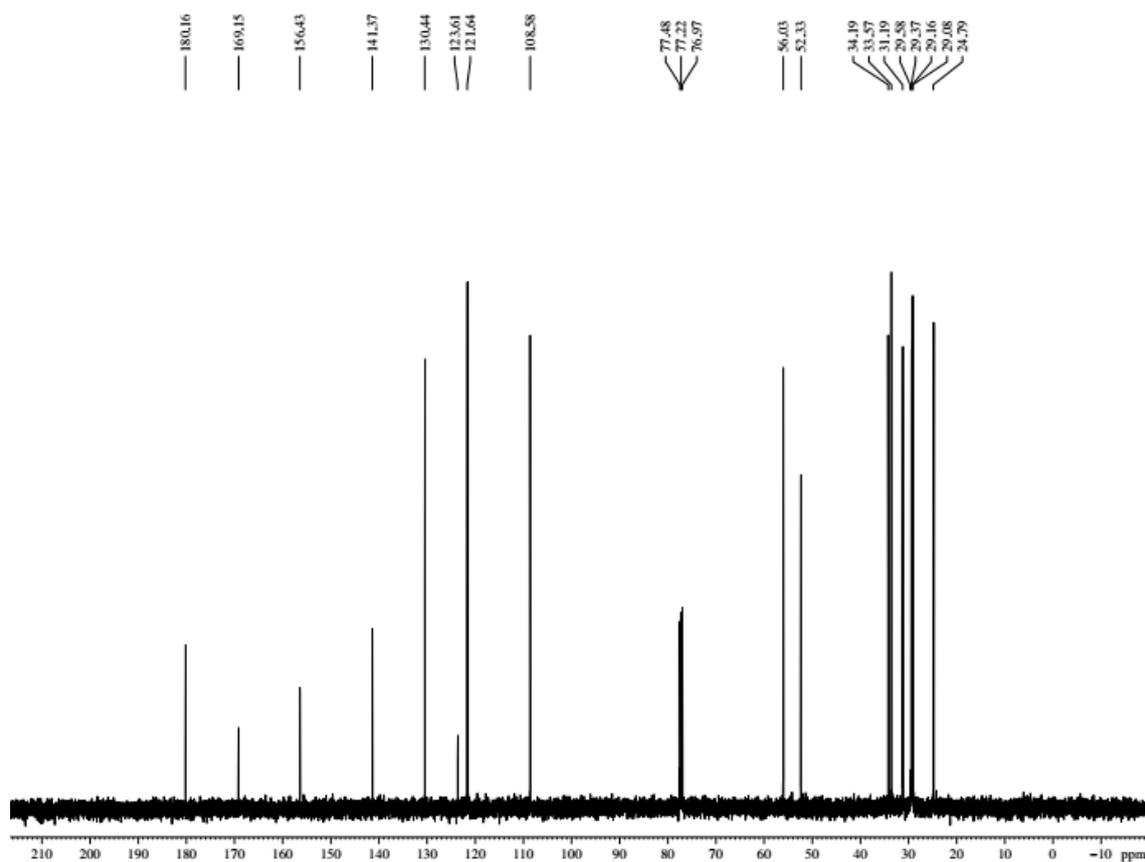
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)



ANEXO 11

LDT394

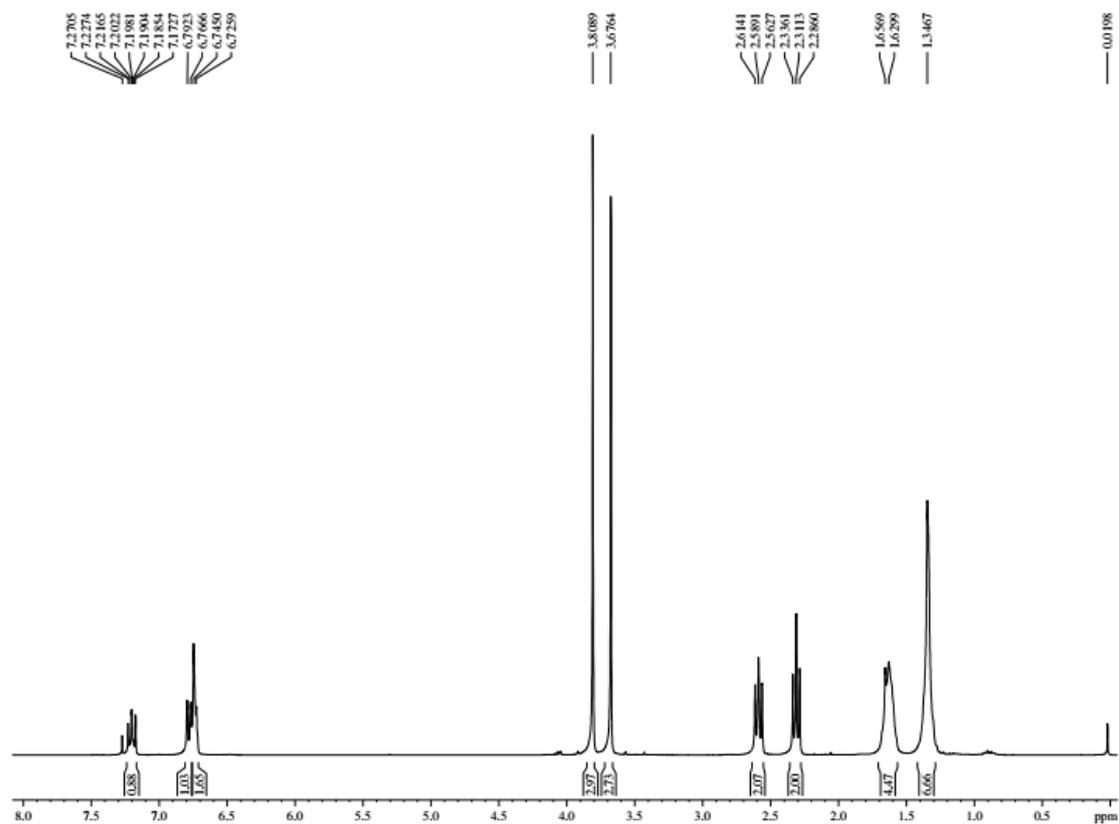
Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)



ANEXO 12

LDT483

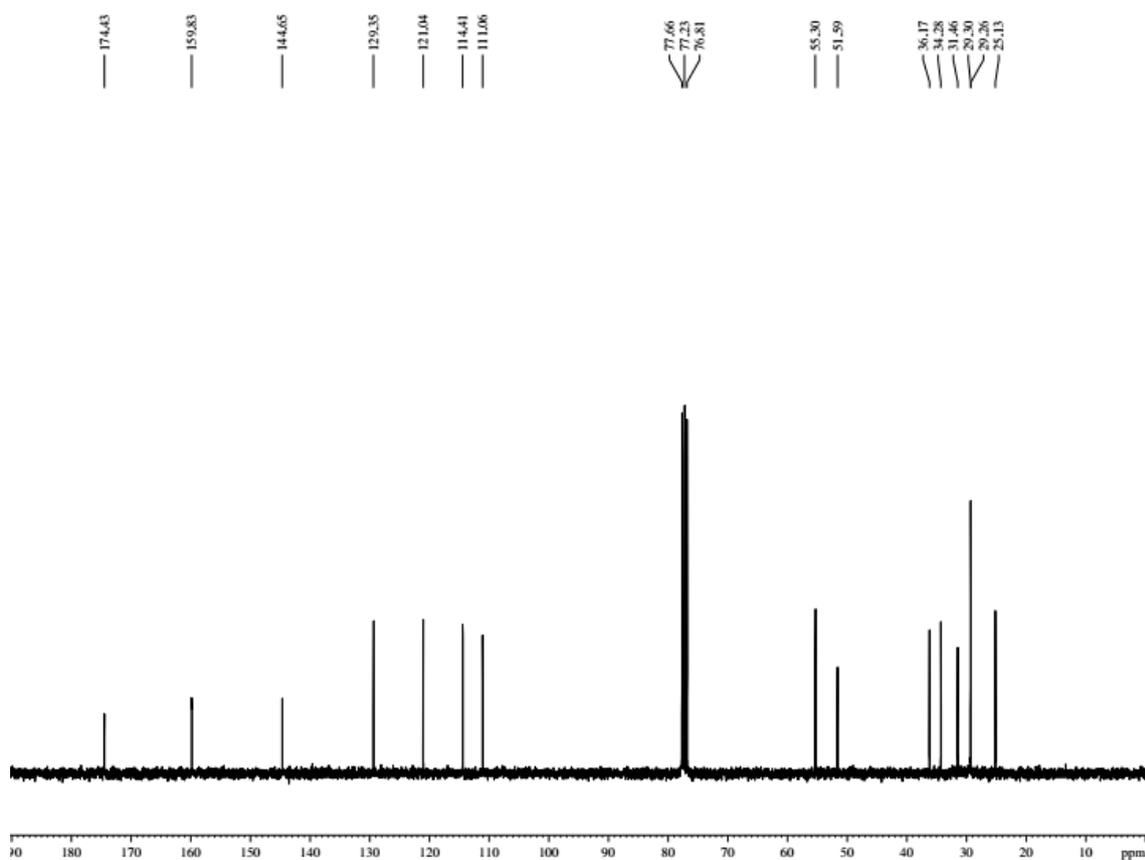
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)



ANEXO 13

LDT483

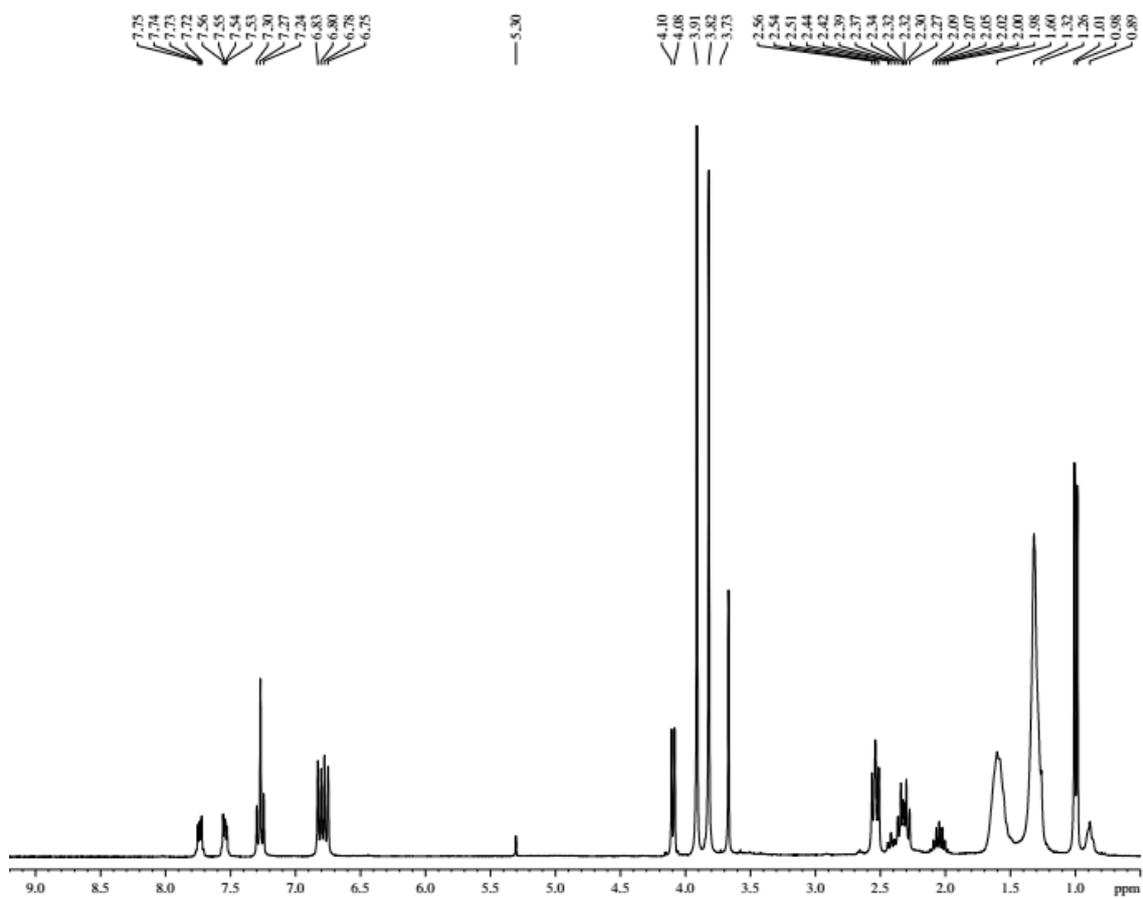
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)



ANEXO 14

LDT395

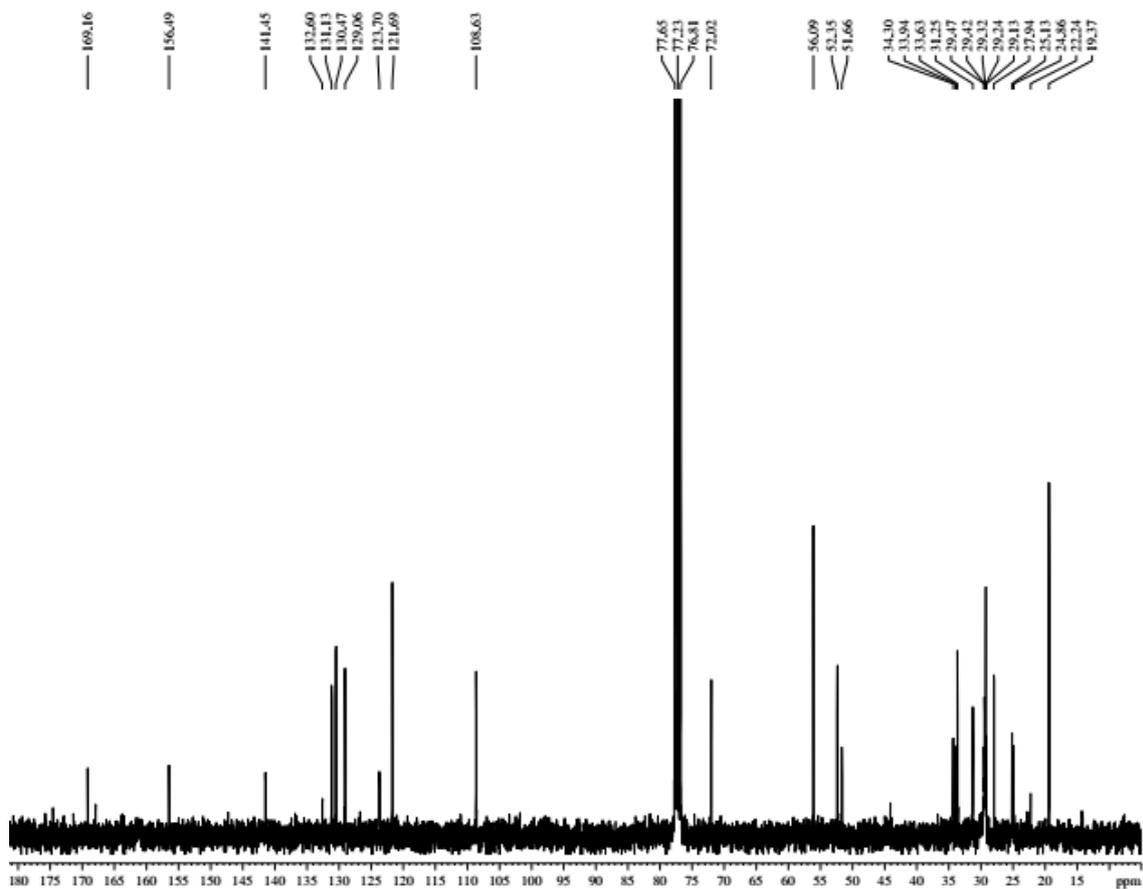
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)



ANEXO 15

LDT395

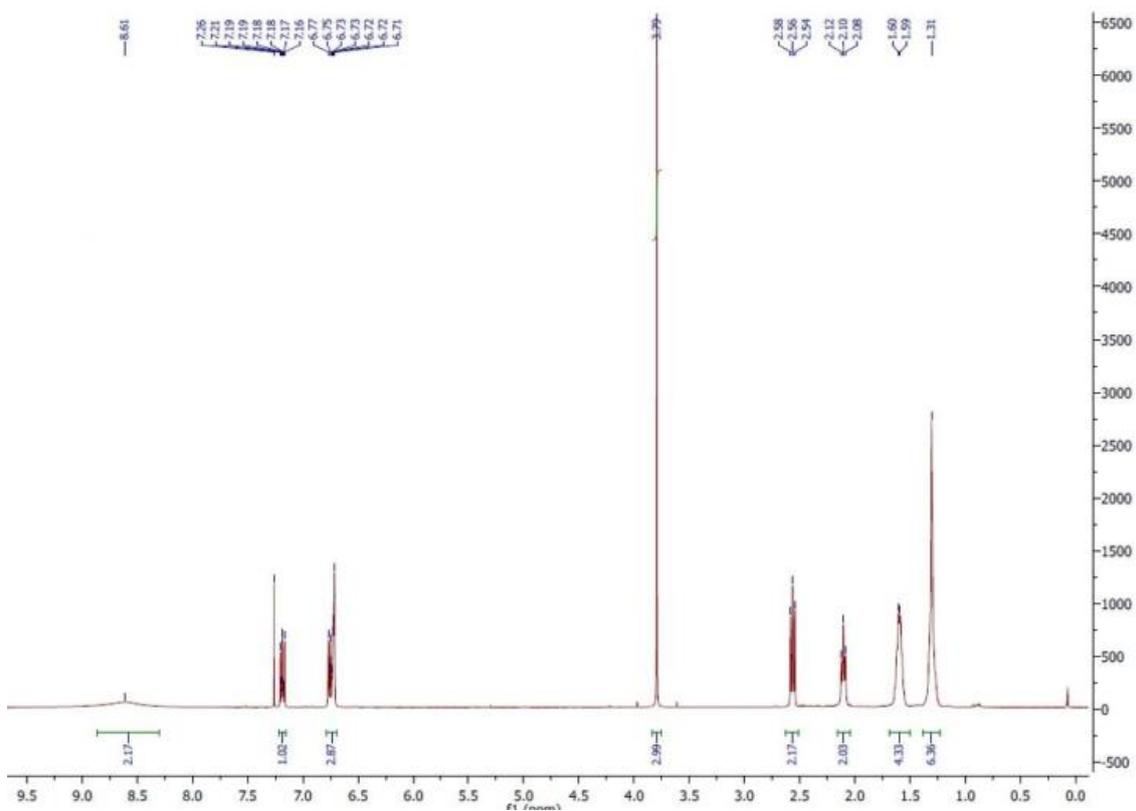
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)



ANEXO 16

LDT536

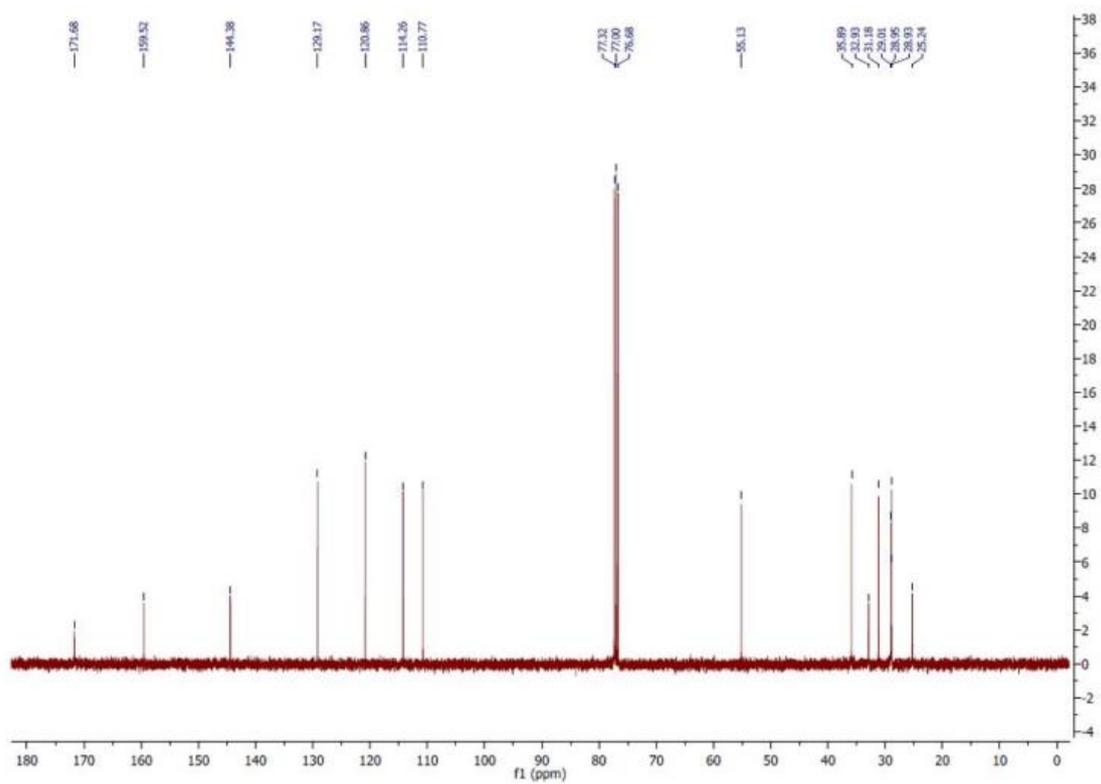
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)



ANEXO 17

LDT536

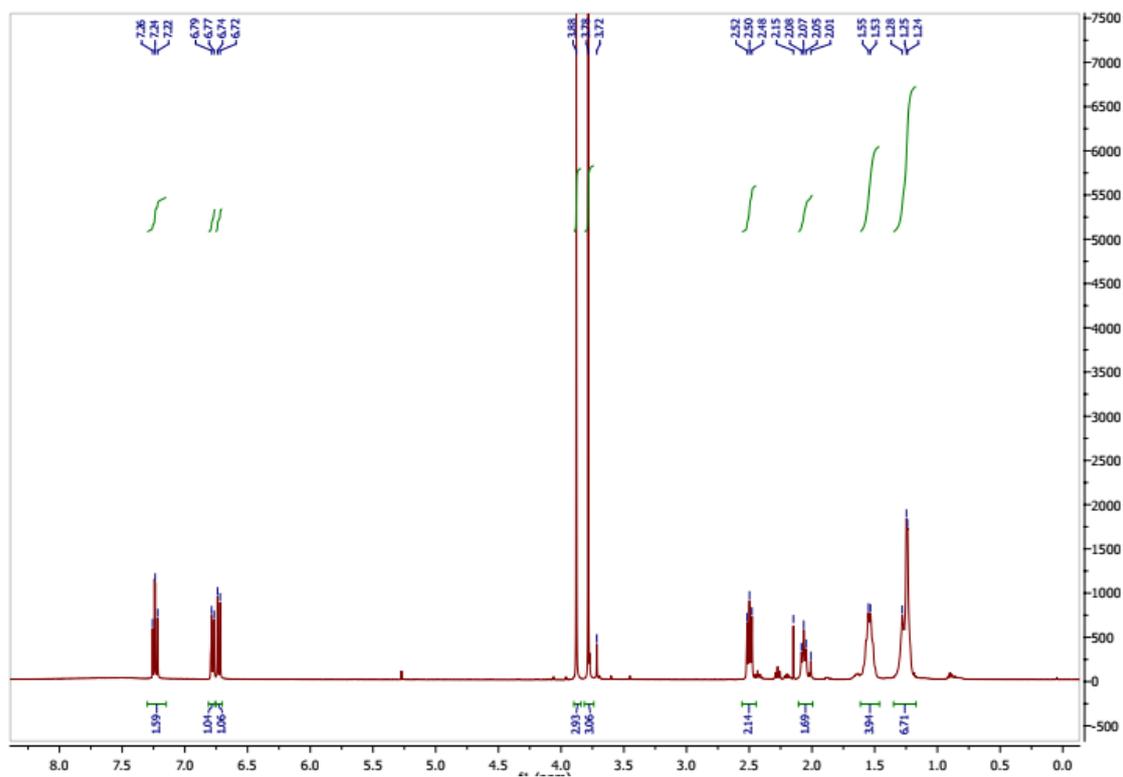
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)



ANEXO 18

LDT537

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)



ANEXO 19

LDT537

Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

