

Fundação Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Mirian Ueda Yamaguchi

**“ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TELIMAGRANDINA II
ISOLADA DA *Ocotea odorifera* E DE DERIVADOS
SEMI-SINTÉTICOS DA TIOSSEMICARBAZIDA”**

Maringá
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MIRIAN UEDA YAMAGUCHI

**“ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TELIMAGRANDINA II
ISOLADA DA *Ocotea odorifera* E DE DERIVADOS
SEMI-SINTÉTICOS DA TIOSSEMICARBAZIDA”**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
de Maringá, como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Co-orientador: Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho

Maringá

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Y19a Yamaguchi, Mirian Ueda
"Atividade antifúngica de telimagrandina II isolada da *Ocotea odorifera* e de derivados semi-sintéticos da tiossemicarbazida" / Mirian Ueda Yamaguchi. -- Maringá, 2009.
51 f. : il., figs. (algumas color), tabs.

Bibliografia : f. 23-34.
Orientador : Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.
Co-orientador : Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 2009.

1. Telimagrandina II - *Ocotea odorifera*. 2. Telimagrandina II - Atividade antifúngica. 3. *Ocotea odorifera* - *Candida parapsilosis*. 4. Tiossemicarbazida - Canfeno - Atividade antifúngica - *Trichophyton mentagrophytes*. 5. Tiossemicarbazida - Limoneno - Atividade antifúngica. 6. Tiossemicarbazida - Canfeno - Atividade antifúngica - Mecanismo de ação. 7. Espectro de massas - Telimagrandina II. 8. Canela-sassafrás. I. Nakamura, Celso Vataru, orient. II. Dias Filho, Benedito Prado, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia e Farmacologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.32323

Dedico este trabalho

Ao Ricardo,

À Natália e Beatriz,

Aos meus pais, Takushi e Eliza,

À Tânia,

**Que com muita paciência compreenderam meu objetivo e
colaboraram na concretização deste trabalho.**

**Que estiveram sempre ao meu lado, apoiando e
incentivando em todos os momentos.**

**Que não mediram esforços para minha formação
pessoal e profissional.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Celso Vataru Nakamura, pela sua valiosa orientação, pela grande oportunidade de compartilhar comigo seus conhecimentos e sua vasta experiência na área científica e principalmente na confiança em mim depositada, registro minha eterna gratidão.

Ao Professor Doutor Benedito Prado Dias Filho pela inspiração e exemplo de dedicação à ciência.

Ao Professor Doutor Diógenes Aparício Garcia Cortez pela contribuição valiosa e apoio no desenvolvimento da parte experimental no isolamento e identificação dos compostos naturais.

À Professora Doutora Cleuza Conceição da Silva e à Ana Paula Barbosa da Silva pela contribuição na síntese das substâncias semi-sintéticas.

À Professora Doutora Tânia Ueda-Nakamura pelo incentivo, pelos bons conselhos e por compartilhar comigo seus conhecimentos científicos e da vida.

À Adriana Oliveira dos Santos pela ajuda incondicional, por compartilhar seus conhecimentos e experiência, pela contribuição na microscopia eletrônica e em várias outras etapas deste trabalho, além da amizade e incentivo.

À Francielle Pelegrin Garcia pela paciência e auxílio técnico na realização deste trabalho.

Aos colegas Karin Juliana Pelizzaro Rocha, Andrea Mayumi Koroishi, Eliana Harue Endo, Marco Antonio Costa, Jackeline Guinoza Siraichi, Rodrigo Hinojosa Valdez, Patrícia Regina Santos, Simone Evellyn Daniel Hernandez, Tatiana Shioji Tiuman, Helena Teru Takahashi, Gislaine Franco de Moura Costa, Marinete

Martinez Vicentim, Maria Aparecida Manzotti, Rosana Ferreira Carli, Adriana Rosseti e todos os demais colegas, funcionários, estagiários e colaboradores do Laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Estadual de Maringá que através da troca de experiências, amizade e companheirismo, de forma direta ou indireta, muito me ajudaram neste trabalho.

Àos doutores Mislaine Adriana Brenzan e Daniel Rodrigues Silva e aos funcionários e estagiários do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Maringá, que com muita disposição dividiram seus conhecimentos e muito me ajudaram nos experimentos de extração e isolamento de substâncias da planta.

Ao Michael Murgu, pelo precioso auxílio com a análise ESI-MS/MS.

Ao Vagner Roberto Batistella pelo cálculo computacional para otimização de estrutura das tiossemicarbazidas.

À Natália Ueda Yamaguchi pela sua paciência e colaboração na realização dos gráficos e competência nos assuntos de informática.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, representados Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e Francisca Helena Mesquita de Carvalho, demais professores, alunos e colaboradores, que contribuíram e tornaram possível a realização deste trabalho.

A todos os docentes e funcionários do Centro de Ciências da Saúde e do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá que ao longo destes anos contribuíram de forma significativa neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo
apoio neste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	01
Introdução.....	01
Medicina tradicional e as plantas medicinais.....	01
Importância das plantas medicinais na descoberta de fármacos.....	02
Atividade antimicrobiana e antiviral das plantas.....	05
Síntese de novos compostos a partir de produtos naturais.....	08
Extração e isolamento de moléculas bioativas.....	09
Atividade antimicrobiana dos produtos semi-sintéticos.....	11
Modelo molecular: protótipo para novos fármacos antifúngicos.....	13
Os fungos e as principais classes de antifúngicos.....	15
As infecções fúngicas na atualidade.....	17
Justificativas para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.....	19
Objetivos.....	22
Referências bibliográficas.....	23
CAPÍTULO II	35
Artigo 01 - Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of <i>Ocotea odorifera</i> (Lauraceae)	
Artigo 02 - Effects of thiosemicarbazide camphene derivative on <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
CAPÍTULO III	36
Conclusões.....	36
Perspectivas futuras.....	39
ANEXO 1	40

Resultados complementares.....	40
1. Estudos estruturais por MS/MS.....	40
2. Alterações morfológicas e estruturais de <i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i>	44
3. Estrutura otimizada do TIO C e do TIO L.....	51

CAPÍTULO I

Introdução

Medicina tradicional (MT) e as plantas medicinais

Durante milhares de anos a MT tem sido utilizada pelos povos de todos os continentes. A MT é a soma do conhecimento, habilidade e práticas baseadas nas convicções e experiências dos antigos povos de diferentes culturas, que utilizam para a manutenção da saúde, assim como para a prevenção e tratamento das doenças físicas e mentais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008), nos países asiáticos e africanos, 80% da população depende da MT como primeira ou a única opção para os cuidados básicos da saúde. Nos países desenvolvidos, cerca de 70 a 80% da população utiliza ou já utilizou alguma forma de MT, como por exemplo, as plantas medicinais ou a acupuntura. As plantas medicinais representam a forma mais popular da MT.

As plantas representam entre 250.000 a 500.000 espécies em todo o planeta e existem evidências de que a busca pelo poder curativo das plantas data do período pré-histórico, há 60.000 anos, porém relatos da aplicação das plantas no tratamento das doenças datam dos últimos 5.000 anos (Liu & Wang, 2008).

Comercialmente as plantas medicinais são altamente lucrativas no mercado internacional. A receita anual na Europa ocidental foi de 5 bilhões de dólares entre os anos de 2003-2004. Em 2005, na China, a venda dos produtos totalizou 14 bilhões de dólares e no Brasil as plantas medicinais renderam um provento de 160 milhões de dólares no ano de 2007 (OMS, 2008). Estas cifras mostram que a prática da MT, na forma de vegetal *in natura*, extratos brutos, formulações

manipuladas ou industrializadas a partir de princípios ativos de plantas, está cada vez mais difundida entre diferentes culturas e continentes. Porém a eficiência e segurança dos extratos e ingredientes ativos são raramente avaliados. A OMS tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização desses compostos como fitoterápicos e de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido.

Importância das plantas medicinais na descoberta de fármacos

A ampla pesquisa na literatura referente às atividades biológicas das plantas medicinais mostra historicamente que as mais diversas doenças humanas têm relatos de tratamento com a utilização de extratos de plantas. A pesquisa etnofarmacológica relata as atividades analgésica, anestésica, antimicrobiana, anticâncer, antialérgica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, anti-hiperglicêmica, anti-trombótica, imunoestimulante, entre outras diversas atividades biológicas.

Na pesquisa de novos fármacos a investigação etnofarmacológica representa uma grande contribuição na descoberta de novas moléculas bioativas. Devido às patologias de maior impacto à humanidade possuírem caráter infeccioso ou neoplásico, as pesquisas científicas foram amplamente direcionadas no desenvolvimento de produtos naturais com atividade antimicrobiana e anticancerígenas. Alguns exemplos clássicos de produtos naturais obtidos de plantas são citados a seguir. Dentre as plantas medicinais tradicionais com atividade anti-protozoário, a *Artemisia annua* L. (Asteraceae) é utilizada na China há mais de 2.000 anos no tratamento da febre e da malária. Em 1972, cientistas

chineses isolaram a molécula ativa artemisina, uma lactona sesquiterpênica utilizada na produção do Artemotil[®], um potente fármaco com ação antimalárica (Cowan, 1999; Graul, 2001). O calanolide A, produto natural isolado de *Calophyllum lanigerum* var *austrocoriaceum* (Clusiaceae), planta encontrada nas florestas da Malásia, apresenta um mecanismo de ação específico contra as cepas HIV resistentes à zidovudina (AZT) (Creagh et al., 2001). Outros compostos cumarínicos e triterpênicos, respectivamente extraídos das plantas *Lomatium suksdorfii* (Apiacea) e a *Syzygium claviflorum* (Myrtaceae), estão sendo exaustivamente estudados por apresentarem potente atividade antiviral, com grandes perspectivas de serem brevemente lançados no mercado da indústria farmacêutica mundial para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Itokawa et al., 2008).

A pesquisa de fármacos para o combate do câncer é um capítulo à parte, pois segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2009), cerca de 10,4 milhões de novos casos de câncer foram registrados em todo o mundo em 2007, com aproximadamente 6,5 milhões de casos de morte provocados por esta doença. Estima-se que no ano de 2030 existirá entre 20 a 25 milhões de casos de câncer no mundo, com 13 a 16 milhões de mortes anuais. Segundo estatísticas americanas, nos EUA o câncer é a segunda maior causa de morte, superado apenas pelas doenças cardiovasculares. Assim, nos últimos cinquenta anos, os estudos para desenvolvimento de novos fármacos têm sido focos de grande interesse.

Aproximadamente 47% dos fármacos anti-câncer utilizadas clinicamente são produtos naturais ou diretamente derivados destes (Newman & Cragg, 2007), dentre os quais, compostos ativos como alcalóides, lignanas e terpenos são isolados das plantas *Vinca rosea*, *Taxus brevifolia*, *Camptotheca acuminata*, *Podophyllum peltatum*, *Colchicum autumnale*, *Salvia miltiorrhiza*, *Brucea antidysenterica*, *Euphorbia kansui*, *E. lagascae*, *Rubia akane*, *R. cordifolia*, *Cocculus trilobus*, *Curcuma aromatica* e *Maytenus illicifoli*. Estas espécies foram testadas a partir da indicação pelo uso popular na MT (Itokawa et al., 2008).

Doenças de outras naturezas também possuem tratamentos estabelecidos a partir de medicamentos obtidos de produtos naturais de plantas. No tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), o medicamento patenteado como Spiriva[®] possui efeito broncodilatador anticolinérgico, mais eficaz e durador que outros medicamentos rotineiramente utilizados. Sua ação é comprovadamente atribuída ao tiotropium, composto isolado da planta *Atropa belladonna* L. (Solanaceae) (Mundy & Kirkpatrick, 2004). O composto galantamina, é um produto natural isolado por volta de 1950, na Rússia, da planta *Galanthus woronowii* Losinsk (Amaryllidaceae), e é atualmente utilizado pela indústria farmacêutica para a fabricação do Reminyl[®], medicamento prescrito no tratamento da doença de Alzheimer, cuja ação é retardar o processo neurológico degenerativo, pela inibição da acetilcolinesterase (Heinrich & Teoh, 2004). Em fase de estudos avançados, a substância morfina-6-glucoronida (M6G) que é um derivado da morfina, extraída da planta *Papaver somniferun* L. (Papaveraceae), representa uma alternativa no

tratamento de dor e febre, pois apresenta menos efeitos colaterais que a morfina (Dahan et al., 2008).

Atividade antimicrobiana e antiviral das plantas

A grande biodiversidade da flora brasileira está relacionada ao clima tropical que é extremamente favorável ao crescimento das plantas, assim como propício ao desenvolvimento de muitas espécies de micro-organismos, como fungos e bactérias. Desta forma, as plantas destes “habitats” contêm grandes quantidades de metabólitos secundários que as protege da ação prejudicial dos micro-organismos, e torna estas plantas ideais para a pesquisa de novas moléculas com atividade antimicrobiana (Boer et al., 2005)

As plantas têm uma habilidade ilimitada em sintetizar substâncias, o qual se estima que apenas 12.000 metabólitos tenham sido isolados, número este inferior a 10% do total estimado existente na natureza. A Tabela 1 resume as principais categorias de antimicrobianos de origem fitoquímica e seus respectivos mecanismos de ação (Cowan, 1999; Samy & Gopalakrishnakone, 2008).

Extraídas da flora brasileira, estudos recentes demonstram comprovada atividade antimicrobiana de uma diversidade de plantas utilizadas na medicina popular (Holetz et al., 2002). A cumarina isolada da planta *Chaptalia nutans* (Truiti et al., 2003), as xantonas da *Kielmeyera variabilis* (Pinheiro et al., 2003), as neolignananas da *Piper regnellii* (Pessini et al., 2003), os óleos essenciais da *Piper ovatum* (Silva et al., 2009), *Copaifera martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* (Santos et al., 2008a; Santos et al., 2008b) possuem comprovada atividade antibacteriana.

Tabela 1. Principais classes de compostos antimicrobianos derivados de plantas.

Classe	Sub-classe	Exemplo	Mecanismo
Fenóis	Fenóis simples	Catecol	Privação do substrato
		Epicatequinas	Rompimento da membrana
	Ácidos fenólicos	Ác. Cinâmico	-
	Quinonas	Hiperecina	Ligação a adesinas, complexação com a parede celular e inativação de enzimas
	Flavonóides	Crisina	Ligação às adesinas
	Flavonas		Complexação com a parede celular, inativação de enzimas
	Taninos	Elagitaninos	Ligação às proteínas, inibição de enzimas, privação de substrato, complexação com a parede celular, rompimento da membrana
	Cumarinas	Varfarinas	Interação com DNA eucariótico
Terpenóide		Capsaicinas	Rompimento de membrana
Alcalóides		Berberina, Piperina	Complexação à parede celular e/ou DNA
Lectinas e polipetídeos		Fabatina	Bloqueio da fusão viral ou adsorção

(-) Mecanismo de ação desconhecido

Os extratos metanólicos das plantas medicinais utilizadas popularmente na região sul do Brasil, *Ocotea odorifera*, *Eugenia uniflora* e *Parapiptadenia rigida* apresentam atividades antibacterianas (Souza et al., 2004).

As lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais e cumarinas isoladas das plantas *Tanacetum parthenium* (Tiuman et al., 2005), *Ocimum gratissimum* (Ueda-Nakamura et al., 2006) e *Calophyllum brasiliense* (Brenzan et al., 2007), respectivamente, e o óleo essencial de algumas espécies do gênero *Copaifera* (Santos et al., 2008a) apresentam atividade antileishmania. A espécie *Piper regnellii* possui efeito contra *Trypanosoma cruzi* (Luize et al., 2006) devido a atividade de seu metabólito secundário, a neolignana, enquanto o partenolídio isolado do *Tanacetum parthenium* apresenta atividade antitripanossoma (Izumi et al., 2008) e também atividade antiviral (Onozato et al., 2009).

A utilização de plantas no tratamento de micoses é prática muito comum em alguns países como o Brasil, México, China e países africanos (Boer et al., 2005; Cruz et al., 2007; Alanís-Garza et al., 2007). A atividade antifúngica contra dermatófitos foi demonstrada em neolignanas isoladas da *Piper regnellii* (Koroishi et al., 2008) e no extrato aquoso das plantas *Ziziphus joazeiro* e *Caesalpineia pyramidalis* (Cruz et al., 2007). Os compostos menthol e eugenol, isolados da *Mentha longifolia* (Al-Bayati, 2009) e da *Ocimum gratissimum* (Nakamura et al., 2004), respectivamente, possuem atividade inibitória sobre espécies de *Candida*. Ishida e colaboradores (2006) encontraram atividade contra *C. albicans* em taninos isolados da planta *Stryphnodendron adstringens*.

Os elagitaninos, pertencentes a uma subclasse dos taninos, também conhecidos como taninos hidrolisáveis, são amplamente estudados em países de

clima frio que consomem frutos silvestres, popularmente conhecidos por “berry”. São extraídos de plantas como a *Vaccinium myrtillus*, *V. vitis-idaea*, *Ribes nigrum*, *Rubus chamaemorus*, *R. idaeus*, entre outras, que apresentam atividade antifúngica contra *C. albicans*, além de importante efeito antibacteriano sobre patógenos intestinais dos gêneros *Salmonella*, *Listeria* e *Staphylococcus* (Puupponen-Pimiä et al., 2005).

A correlação entre uma fonte de produtos naturais e a descoberta de moléculas ativas, tem maiores chances de sucesso quando orientada pelo uso da planta na medicina popular, visto que é muito mais provável encontrar atividade biológica nestas plantas do que naquelas escolhidas ao acaso.

Síntese de novos compostos a partir de produtos naturais

Newman e Cragg (2007) realizaram uma vasta pesquisa sobre os novos fármacos obtidos a partir de produtos naturais num período de 25 anos, entre os anos de 1981-2006. O resultado da pesquisa mostrou que neste período 1184 novas moléculas ativas foram isoladas, apresentando grande diversidade de atividades farmacológicas, porém em sua maioria foram avaliadas as atividades antimicrobianas e anticâncer. Dentre as novas moléculas, apenas 5% são produtos naturais na sua forma inata e 23% são compostos derivados de um produto natural, denominados de produtos semi-sintéticos.

A vinblastina e vincristina são os alcalóides vinca, isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), cuja propriedade é bloquear a mitose, pela despolimerização do microtúbulo, durante a metáfase. São empregados no tratamento do linfoma de Hodgkin e na leucemia linfóide infantil (Okouneva et al.,

2003). Análogos sintéticos da vinblastina e vincristina têm sido desenvolvidos no intuito de combater outros tipos de tumor e diminuir os efeitos adversos. Entre os análogos sintéticos podemos citar a vinorelbina, vindesina e vinfluvina, desenvolvidos para o tratamento de câncer pulmonar, leucemia linfóide aguda e câncer de mama, respectivamente (Itokawa et al., 2008).

A descoberta da atividade antineoplásica do diterpeno taxol revolucionou a quimioterapia no tratamento do câncer de mama. Sua atividade ocorre pela ligação da molécula de taxol à tubulina, promovendo a despolimerização do microtúbulo e inibindo a mitose. Porém a sua obtenção a partir da casca da árvore *Taxus brevifolia* (Taxaceae) é extremamente limitada. A alternativa de uma fonte de abastecimento renovável foi encontrada pela produção de derivados semi-sintéticos (taxotere, ortataxel), a partir da pesquisa de aproximadamente 400 taxóides obtidos de outras espécies do gênero *Taxus* (Shiguemori & Kobayashi, 2004). A exemplo do taxol e dos alcalóides vinca, inúmeros fármacos são produto de intensos estudos da relação estrutura-atividade de compostos análogos e compostos derivados de produtos naturais.

Extração e Isolamento de moléculas bioativas

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. Os fatores ambientais como clima, tipo de solo, época da coleta, são fatores que influenciam na biossíntese dos metabólitos secundários.

A partir da orientação do uso popular das plantas, moléculas com características polares como os taninos, saponinas, glicosídeos e flavonóides glicosilados, são os compostos ativos mais comumente isolados, visto que as preparações caseiras usualmente são realizadas por infusão em água, o que favorece a dissolução destas moléculas polares.

Metodologia de semi-purificação de extratos de partes de plantas são classicamente utilizadas a partir da filtração do extrato alcoólico bruto em sílica gel com solventes de polaridades crescentes, proporcionando a separação das substâncias pela polaridade. Estes extratos semi-puros são testados biologicamente e a fração ativa é submetida a procedimentos cromatográficos para obter-se o isolamento e elucidação estrutural da molécula ativa. O uso em conjunto de técnicas espectrais uni e bidimensionais permitem propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais.

A primeira parte deste trabalho descreveu o isolamento da molécula biologicamente ativa, telimagrandina II (Fig.1), que apresentou potente atividade antifúngica. Foi isolada da planta *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, conhecida

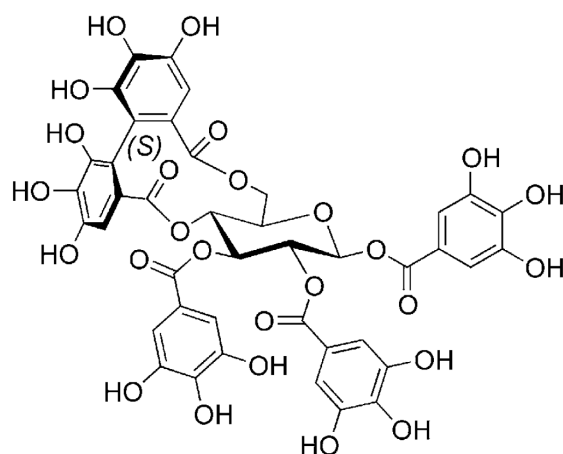


Figura 1. Estrutura química da telimagrandina II

popularmente como “canela-sassafrás” e empregada pela MT no tratamento de dermatoses, febre e malária (Souza et al., 2004).

Atividade antimicrobiana dos produtos semi-sintéticos

Os compostos naturais com atividade biológica são classificados segundo Butler (2008) de modo simplificado em três grupos, produtos naturais, produtos naturais semi-sintéticos e os derivados de produtos naturais. Os produtos naturais semi-sintéticos são derivados de um produto natural pelo processo da semi-síntese ou síntese parcial, enquanto os derivados de produtos naturais são produzidos sinteticamente ou inspirado em seu modelo molecular.

Dentre as drogas antimicrobianas de origem semi-sintéticas com uso consolidado no mercado farmacêutico estão o Artemotil[®], cuja molécula ativa foi originalmente isolada da planta *Artemisia annua*, com atividade anti-malária; os antifúngicos Cancidas[®] (caspofungin) e Funguard[®](micafungin), que possuem seus princípios ativos extraídos originalmente de fungos do gênero *Streptomyces* (Butler, 2004)

Dentre os semi-sintéticos recentemente lançados no mercado farmacêutico estão os antibacterianos Tygacyl[®] e Altabax[™], produtos de semi-síntese da tetraciclina e pleuromutilina, respectivamente, e os antifúngicos Eraxis[™] e Ecalta[™], ambos derivados semi-sintéticos da anidulafungina, pertencente à classe das equinocandinas (Butler, 2008).

Na segunda parte deste trabalho foram selecionados os produtos naturais canfeno e limoneno, abundantes no canfoeiro (*Cinnamomum camphora*) e nas

frutas cítricas (*Citrus limon*, *C. sinensis*), respectivamente, e realizou-se a semi-síntese de novos derivados tiossemicarbazídicos, com o intuito de potencializar a atividade antifúngica.

Salgin-Göksen e colaboradores (2007) relataram moderada atividade antifúngica de derivados tiossemicarbazídicos contra cepas de *Candida krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* e atividade sobre outros fungos *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum audouinii*, *M. gypsum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus niger* foram relatadas por outros autores (Pandeya et al., 1999; Rameshkumar et al., 2003).

Os produtos naturais canfeno e limoneno são relatados na literatura pela atividade antifúngica sobre *Candida*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* e *Penicillium*, na forma de óleos essenciais obtidos das plantas *Valeriana officinalis* (Letchamo et al., 2004), *Ambrosia trifida* (Wang et al., 2006), *Sesuvium portulacastrum* (Magwa et al., 2006) e *Citrus sinensis* (Shrama & Tripathi, 2008).

As tiossemicarbazidas monoterpênicas podem ser sintetizadas pela adição de hidrazina aos isotiocianatos (Fig. 2). Esta síntese fornece um bom rendimento do produto semi-sintético, descrito na literatura por apresentar diversas atividades biológicas (Silva et al., 1993).

A proposta de semi-síntese de tiossemicarbazidas derivados do (-) canfeno e do R(+) limoneno, surgiu a exemplo de tantos outros compostos semi-sintéticos com atividades biológicas melhoradas e consequentemente utilizados no desenvolvimento de novos fármacos.

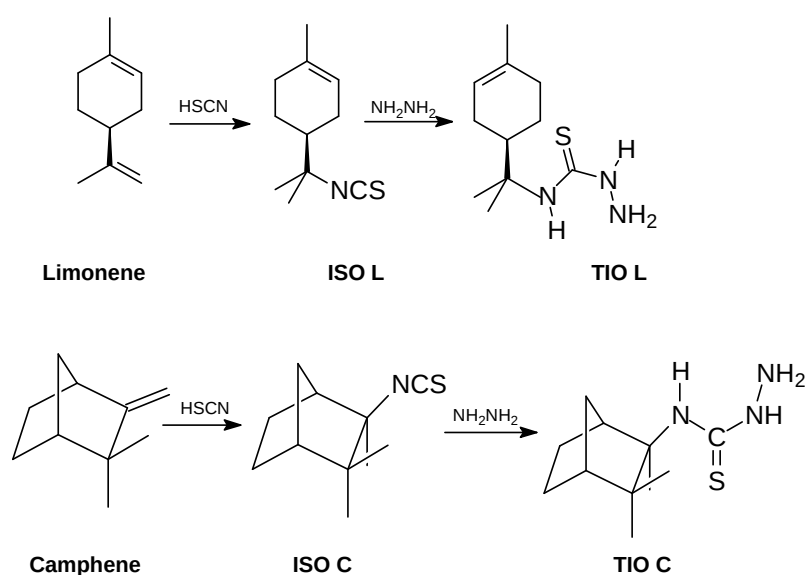


Figura 2. Síntese das tiossemicarbazidas monoterpênicas: TIO L e TIO C

Modelo molecular: protótipo para novos fármacos antifúngicas

A interação da molécula ativa de um fármaco e a célula fúngica depende de fatores relacionados com a sua estrutura química e consequentemente, de suas propriedades físico-químicas. Segundo Hansch e Leo (1995), entre as propriedades físico-químicas mais importantes para o estabelecimento da atividade biológica de fármacos citam-se a distribuição eletrônica, a hidrofobicidade e a estereoquímica da molécula. Cada uma destas propriedades contribui em maior ou menor intensidade para o estabelecimento de resposta biológica. A formulação de novos protótipos com atividade antifúngica pode ser determinada a partir de uma molécula líder ou padrão, que é aquela molécula comumente descoberta em um material de origem natural, como os metabólitos secundários das plantas medicinais. Pela inserção de grupos substituintes na molécula padrão é possível obter derivados com maior interesse terapêutico,

devido apresentar maior atividade biológica, menor toxicidade ou ainda características farmacotécnicas mais adequadas.

As variações na estrutura de um composto bioativo normalmente resultam na modificação da hidrofobicidade da molécula. Como a resposta biológica está diretamente relacionada com os mecanismos de absorção, distribuição e atividade intrínseca é importante reconhecer que a hidrofobicidade de um fármaco determina a extensão e a velocidade de sua absorção e distribuição, a sua capacidade de ligação ao sítio receptor, bem como a sua biotransformação e excreção.

O estudo da estereoquímica de novos derivados obtidos através de grupos substituintes em uma molécula bioativa é muitas vezes decisivo para a compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da atividade biológica do fármaco. A teoria da ação dos fármacos se baseia no princípio de ajuste entre a estrutura molecular do fármaco e seu receptor, e considera entre outras propriedades, a flexibilidade presente nas biomacromoléculas envolvidas. O aspecto tridimensional das moléculas governa os princípios de reconhecimento e discriminação molecular, sendo a estereoseletividade um importante aspecto no desenvolvimento de protótipos para novos fármacos antifúngicos (Kubinyi, 1995).

Modelos de QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships), ou relação estrutura-atividade quantitativa vêm sendo progressivamente desenvolvidos nos últimos 40 anos, aplicados de forma a descrever quantitativamente as relações entre a estrutura química de moléculas e a sua atividade biológica. No modelo descrito por Hansch e Leo (1995), após a descoberta de uma estrutura líder responsável por uma atividade biológica

desejável, planeja-se novos análogos com as escolhas dos substituintes embasado em equações matemáticas simples ou multiparamétricas envolvendo correlações entre a atividade biológica e descritores estruturais. A definição destas equações, a partir do conjunto de dados experimentais é obtida com o auxílio de pacotes computacionais, conhecidos como *softwares*. Ressalta-se que a perspectiva do estudo e desenvolvimento na área de QSAR é bastante ampla, especialmente na área de planejamento farmacêutico de novas drogas, porém há ainda, muito a ser explorado e desenvolvido (Prado-Prado et al., 2009).

Os fungos e as principais classes de agentes antifúngicos

O reino dos fungos é muito diversificado e entre as formas patogênicas ao homem, as leveduras que são espécies unicelulares e os fungos filamentosos, que são espécies que formam hifas ramificadas e produzem arranjos de esporos, são os mais comuns. Em ambos os casos a forma e a integridade do fungo dependem principalmente da estrutura da parede celular, o qual executa importantes funções de prover proteção e papel na interação dos fungos com o meio ambiente (Latgé, 2007). A parede da célula fúngica é uma complexa estrutura composta tipicamente de quitina, 1,3- β - e 1,6- β -glucano, manose e proteínas, entretanto a composição da parede pode variar muito entre as diferentes espécies. A estrutura da parede celular é extremamente dinâmica, sofrendo mudança constante durante a divisão celular, crescimento e morfogênese.

A parede celular que inicialmente tem função como uma barreira que mantém contato com ambientes hostis ao fungo, se removida ou danificada

promove a morte do mesmo. A parede celular pode apresentar funções agressivas, abrigando moléculas hidrolíticas e tóxicas, utilizadas pelo fungo no processo de invasão tecidual de organismos hospedeiros (Adams, 2004).

A membrana celular do fungo é a interface entre a célula fúngica e o ambiente, responsável por funções vitais como comunicação, transporte e funções catalíticas em escala molecular, promovendo a manutenção da homeostase celular. Composta por bicamada fosfolipídica, que dispõe de uma enorme variedade de enzimas com atividades específicas. A membrana plasmática é composta de aproximadamente metade do seu peso em lipídios e a outra metade de proteínas.

De uma forma geral, a atividade dos agentes antifúngicos empregados na clínica médica, está principalmente focada na membrana plasmática e na parede celular do fungo. As classes de agentes antifúngicos mais largamente utilizadas possuem como alvo específico de ação, a membrana plasmática da célula fúngica. Os agentes poliênicos atuam diretamente sobre o ergosterol da membrana fúngica, entre estes, destaca-se a anfotericina B, droga destinada aos tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas. Os azóis, com amplo espectro de utilização, impedem a síntese do ergosterol pela inibição da enzima 14- α -lanosterol demetilase e as alilaninas inibem a enzima esqualeno epoxidase e interrompem a síntese do ergosterol da membrana fúngica.

A mais nova classe de agentes antifúngicos é o grupo das equinocandinas, nas quais a caspofungina, micafungina e anidulafungina inibem a síntese do β (1,3) D-glucano, importante componente da parede celular. Diferentes

mecanismos de ação são apresentados pela griseofulvina que interfere na formação dos microtúbulos impedindo a mitose, enquanto a flucitosina inibe a síntese do DNA (Odds et al., 2003).

De uma forma geral, os principais agentes antifúngicos estão direta ou indiretamente direcionados aos envoltórios celulares, focados na toxicidade seletiva sobre a parede celular fúngica, na ação direta sobre o ergosterol ou indireta sobre a sua biossíntese.

As infecções fúngicas na atualidade

A incidência de infecções fúngicas causadas por leveduras e pelos fungos filamentosos tem crescido nos últimos 20 anos. O quadro é reflexo do aumento do número de pacientes suscetíveis a estas infecções devido à quimioterapia intensiva no tratamento do câncer, ao desenvolvimento de transplantes de medula óssea e de órgãos, à implantação de técnicas cirúrgicas e procedimentos invasivos, aos tratamentos com antibacterianos de largo espectro de ação e à epidemia da AIDS (Cuenca-Estrella et al., 2008). Paralelamente ao aumento do número de pacientes com maior risco de contrair infecções fúngicas, há também o aumento de indivíduos imunologicamente vulneráveis, devido à maior expectativa da sobrevivência de neonatos e da longevidade dos indivíduos idosos, como resultado das tecnologias e avanços na medicina.

As espécies de *Candida* permanecem como a quarta maior causa de morbidade e mortalidade nas unidades de terapia intensiva (Rueping et al., 2009). Os pacientes com candidemia e infecções invasivas por *Candida* estão associados a taxas de mortalidade entre 44 a 71% (Tsai et al., 2008, Bouza &

Muñoz, 2008). Nos últimos 20 anos, a incidência de infecções nosocomiais por outras espécies de *Candida* superou a incidência de *C. albicans*, sendo a *C. parapsilosis* a espécie mais prevalente (Celebi et al., 2008; Al-Sweih et al., 2008; Chang et al., 2008). Segundo Trofa (2008), as infecções nosocomiais por *C. parapsilosis*, estão especialmente associadas às soluções de hiperalimentação via parenteral, dispositivos prostéticos, cateteres e contaminação disseminada nos hospitais pelas mãos dos profissionais da saúde. A *C. parapsilosis* aparece como espécie emergente de candidemia neonatal representando entre 22 a 57% dos casos de neonatos mantidos para cuidados especiais nas unidades de terapia intensiva (Al-Sweih et al., 2008; Celebi et al., 2008), exibindo grande resistência aos fármacos antifúngicos (Malafiej et al., 2009).

Nas últimas décadas, estudos registraram alteração epidemiológica relacionada às infecções fúngicas devido ao uso excessivo de drogas antifúngicas. O fluconazol tem sido amplamente empregado em tratamentos profiláticos e outros agentes antifúngicos são largamente utilizados em terapias empíricas, que resultaram no aumento do número de infecções provocadas por fungos filamentosos (Malani & Kauffman, 2007).

Os fungos filamentosos dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* infectam o tecido queratinizado da pele, o cabelo e as unhas de humanos. As infecções são geralmente cutâneas e restritas a camadas superficiais, devido à incapacidade do fungo em penetrar tecidos e órgãos de indivíduos imunocompetentes. A reação inflamatória de uma infecção por dermatófitos pode variar de moderada a severa, e as consequências da reação do

hospedeiro dependem dos produtos metabólicos do fungo, da virulência da cepa, da região anatômica comprometida e dos fatores ambientais.

Os fungos dermatófitos causam geralmente infecções não fatais, porém extremamente problemáticas como a tinha pedis (“pé-de-atleta”) e as infecções de unha, conhecidas por onicomicoses, de difícil tratamento. Porém muitas outras manifestações clínicas são atribuídas aos dermatófitos, a maioria delas conhecidas como tinhas. Dentre as espécies de fungos dermatófitos, as pertencentes ao gênero *Trichophyton* estão entre as mais prevalentes, sendo *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* responsáveis por cerca de 90% das infecções causadas por este gênero. A espécie *T. mentagrophytes* é o principal agente etiológico da tinha pedis (Campbell et al., 2004; Loo, 2007; Havlickova et al., 2008).

A prevalência global das infecções por fungos dermatófitos é crescente e além de serem infecções difíceis de erradicar, ocorre recorrência em mais de 25 a 40% dos casos (Hay, 2001).

Justificativas para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos

Doenças como câncer e AIDS predominam dentre os interesses que buscam novos medicamentos e a cura. Mas, existem também prioridades dadas às doenças infecciosas, inclusive as infecções fúngicas.

A maioria das classes de antifúngicos atualmente disponíveis no mercado apresenta uma ou mais limitações, como efeitos colaterais acentuados, estreito espectro antifúngico, pouca penetração em certos tecidos e seleção dos fungos resistentes. A resistência antifúngica contribui para o aumento na incidência de

infecções fúngicas, principalmente as nosocomiais, e estão associadas ao aumento do período de hospitalização, trazendo um grande impacto financeiro e, alto risco de morte dos pacientes.

Há grande interesse no desenvolvimento de novas moléculas bioativas com efeito antifúngico visto que existe um número limitado de drogas antifúngicas. É difícil encontrar alvos fúngicos apropriados, uma vez que os fungos, como os seres humanos, são organismos eucariotos, com processos celulares e moleculares semelhantes, que resultam com frequência em homologia entre os genes e proteínas.

Estudos que leve ao desenvolvimento de novos fármacos, mais seguros, mais baratos e que apresente baixa resistência, é alvo de grande interesse no combate às doenças provocadas por fungos.

A exemplo da anfotericina B, droga de escolha no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, apresenta várias reações adversas, sendo a nefrotoxicidade seu efeito citotóxico mais grave. Outros aspectos como a sua longa meia-vida, períodos prolongados de tratamento e baixo nível de eliminação da droga pelo organismo tornam a anfotericina B um grande candidato a produzir efeito genotóxico, conforme comprovado por Jayanthi e Subramanyam (1995).

A descoberta de moléculas bioativas com alguma atividade antimicrobiana, pode despertar grandes avanços no desenvolvimento de novos fármacos. Uma molécula bioativa em combinação com outras substâncias, como fármacos empregados na medicina convencional, fitofármacos, produtos semi-sintéticos ou totalmente sintéticos podem produzir efeitos terapêuticos desejáveis, como mecanismos sinérgicos devido à maior solubilidade e biodisponibilidade de uma

ou ambas as substâncias ativas. Outro especial efeito sinérgico que pode ocorrer entre fármacos, é aquele onde um agente pode antagonizar um mecanismo de resistência antifúngica (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Pesquisas que apresentem estes ou outros resultados sinérgicos podem contribuir grandemente no combate às infecções fúngicas. Principalmente nos processos provocados pelas cepas que, nos últimos anos tem demonstrado maior potencial em causar infecções invasivas e de difícil tratamento, relacionadas à população submetida à profilaxia antifúngica e terapias empíricas (Malani & Kauffman, 2007, Bouza & Muñoz, 2008).

A associação do conhecimento milenar das propriedades terapêuticas das plantas medicinais e o avanço tecnológico, que disponibiliza ferramentas que facilitam o isolamento de moléculas bioativas e a comprovação de sua eficácia terapêutica, promovem maiores perspectivas na descoberta e consequente desenvolvimento de fármacos mais eficazes, que podem apresentar-se como produtos puramente naturais ou derivados semi-sintéticos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar a atividade antifúngica da telimagrandina II isolada da planta *Ocotea odorifera* e derivados semi-sintéticos da tiossemicarbazida.

Objetivos específicos:

- Verificar os possíveis mecanismos de ação dos compostos sobre os fungos.
- Caracterizar o efeito dos compostos sobre a morfologia e ultraestrutura celular dos fungos.
- Determinar a citotoxicidade e genotocidade do composto ativo isolado da planta *O. odorífera*.
- Avaliar a interação da telimagrandina II com outros fármacos antifúngicos
- Contribuir para a pesquisa no desenvolvimento de fármacos com atividade antifúngica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. J. (2004) Fungal wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**:2029-2035.

AL-BAYATI, F.A. (2009) Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **8**:12-20.

AL-SWEIH,N.; KHAN, Z.; KHAN,S.; DEVARAJAN, L.V. (2008) Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. *Mycoses*, Published on line: DOI 10.1111/j.1439-0507.2008.01637.

ALANÍS-GARZA, B.A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G.M.; SALAZAR-ARANDA, R.; WAKSMAN DE TORRES, N.; RIVAS-GALINDO, V.M. (2007) Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, **114**: 468-471.

BOER, H.J.; KOOL, A.; BROBERG, A.; MZIRAY, W.R.; HEDBERG I.; LEVENFORS, J.J. (2005) Anti-fungal and antibacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, **96**, 461-469.

BOUZA, E.; MUÑOZ, P. (2008) Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Antimicrobial Agents*, **32**: S87-S91

BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.; CORTEZ, D.A.G. (2007) Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, **101**: 715-722.

BUTLER, M.S. (2004) The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, **67**:2141-2153.

BUTLER, M.S. (2008) Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, **25**:475-516.

CAMPBELL, A.W.; ANYANWU, E.C.; MORAD, M. (2004) Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis. *Scientific World Journal* **4**:760-777.

CELEBI, S.; HACIMUSTAFAOGLU, M.; OZDEMIR, O.; OZKAYA, G. (2008) Nosocomial candidaemia in children: results of 9-year study. *Mycoses*. **51**:248-257.

CHANG, M.R.; CORREIA, F.P.; COSTA, L.C.; XAVIER, P.C.; PALHARES, D.B.; TAIRA, D.L.; PANIAGO, A.M.; PONTES, E.R.; MACHADO, V.E. (2008) *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **50**, 265-268.

COWAN, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review.*, **12**:564-82.

CREAGH, T.; RUCKLE, J.L.; TOLBERT, D.T.; GILTNER, J.; EIZNHAMER, D.A.; DUTTA, B.; FLAVIN, M.T.; XU, Z.Q. (2001) Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel, naturally occurring non nucleosidereverse

transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virusnegative human subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**:1379-1386.

CUENCA-ESTRELLA, M.; BERNAL-MARTINEZ, L., BUITRAGO, M.J.; CASTELLI, M.J.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.H. (2008) Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **32**:143-147.

CRUZ, M.C.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, A.M.JR; DE MÉLO, D.L.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. (2007) Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**:409-412.

DAHAN, A.; VAN DORP, E.; SMITH, T.; YASSEN, A. (2008) Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. *European Journal of Pain*, **12**:403-411.

FARKAS, V.; TAKEO, K.; MACEKOVA, D.; OHKUSU, M.; YOSHIDA, S.; SIPICZKI, M. (2009) Secondary cell wall formation in *Cryptococcus neoformans* as a rescue mechanism against acid-induced autolysis. *FEMS Yeasts Research*, **9**:311-320.

FRISCH M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY JR.; J. A., VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA,

J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚŁOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. SCHLEGEL, H.B. *Gaussian 03*, Revision B.04, Gaussian Inc., Pittsburgh: PA, 2003.

GRAUL, A.I.(2001) The year's new drugs. *Drug News and Perspectives*. **14**:12–31.

HANSCH, C.; LEO, A. (1995) Substituent constants for correlation analysis in chemistry: the rational design, mechanistic study and therapeutic Application of chemical compounds, vol 4, Pergamon Press, Oxford.

HAVLICKOVA, B.; VIKTOR, A.C.; FRIEDRICH, M. (2008) Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* **51**:2-12.

HAY, R. J. (2001) The future of onychomycosis therapy may involve a combination of approaches. *Br. Journal of Dermatology*, **145**:3-8.

HEINRICH, M., TEOH, H.L. (2004) Galanthamine from snowdrop the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. **92**:147-162.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**,1027-1031.

International Agency for Research on Cancer – IARC (2009), www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2008/pr182.html

ISHIDA, K.; DE MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. (2006) Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**:942-949.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. (2008) Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *Journal of Natural Medicine*, **62**:263–280

IZUMI, E.; MORELLO, L.G.; UEDA-NAKAMURA, T.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; NAKAMURA, C.V. (2008) *Trypanosoma cruzi*: antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae)

against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology*, **118**:324-330.

JAYANTHI, A.; SUBRAMANYAM, S. (1995) Genotoxicity of the systemic antifungal antibiotic amphotericin B in vitro. *Biologisches Zentralblatt*, **114**:285-293.

KOROISHI, A.M.; FOSS, S.R.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. (2008) In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **117**:270-277.

KUBINYI, H. (1995) Strategies and recent technologies in drug discovery, *Pharmazie*. **50**:647-62.

LATGÉ, J.P., The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* (2007) **66**; 279-290.

LETCHAMO, W.; WARD, W.; HEARD, B.; HEARD, D. (2004) Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 3915-3919.

LIU, Y.; WANG, M. (2008) Botanical drugs: challenges and opportunities. Contribution to Linnaeus Monorial Symposium. *Lifes Sciences*, **82**:445-449.

LOO, D.S. (2007) Onychomycosis in the elderly: drug treatment options. *Drugs Aging* **24**:293-302

LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. (2006) Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, **100**:31-37.

MACCIONI, E.; CARDIA, M.C.; BONSIGNORE, L.; PLUMITALLO, A.; PELLERANO, M.L.; DE LOGU, A. (2002) Synthesis and anti-microbial activity of isothiosemicarbazones and cyclic analogues. *Il Farmaco* , **57**, 809-817.

MACCIONI, E.; CARDIA, M.C.; DISTINTO, S.; BONSIGNORE, L.; DE LOGU, A. (2003) An investigation of biological effect of structural modifications investigation of isothiosemicarbazones and their cyclic analogues. *Il Farmaco*, **58**, 951-959.

MAGWA, M.L.; GUNDIDZA, M.; GWERUA, N.; HUMPHREY, G. (2006) Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. *Jornal of Ethnopharmacology*, **103**, 85–89.

MALANI, A.N., KAUFFMAN, C.A. (2007) Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs*. **67**:1803–181.

MAŁAFIEJ, E., ADAMIEC, A.C.; TWORZYANSKA, U. (2009) Microbial profile and drug resistance of *Candida* strains isolated from the blood of children an 11-year study. *Mycoses*, **52**:149-153.

MUNDY, C.; KIRKPATRICK, P. (2004) Tiotropium bromide. *Nature Reviews Drug Discovery*. **3**:643, 2004.

NAKAMURA, C.V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L.C.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; ROZENTAL, S.; DE SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. (2004) In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. *Research in Microbiology*, **155**:579-586.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. (2007) Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Nature Products*, **70**:461-477.

ODDS, F. C.; BROWN, J.P.; GOW, NEIL, A.R. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *TREND in Microbiology*, **11**:272-279.

OMS - World Health Organization – Traditional medicine (2008), Fact sheet 134, Geneva, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/

ONOZATO, T.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T. (2009) *Tanacetum vulgare*: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide. *Phytotherapy Research*, **23**:791-796.

OSUMI, M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, **29**, 207-233.

PANDEYA, S.N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. (1999) Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derivates from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **9**, 25-31.

PENG, C.; DONG, C.; HOU, QIAOMIN, H.; XU, C.; ZHAO J. (2005) The hydrophobic surface of PaAMP from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal membrane lipid and the antifungal activity. *FEBS Letters*, **579**, 2445-2450.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. (2004) Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 1115-1120.

PINHEIRO, L; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; FERREIRA, A.G.; YOUNG, M.C.; CORTEZ, D.A.G. (2003) Antibacterial xanthones from *Kielmeyera variabilis* mart. (Clusiaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 549-552.

PRADO-PRADO, F.J.; BORGES, F.; PEREZ-MONTOTO, L.G.; GONZÁLEZ-DÍAZ, H. (2009) Multi-target spectral moment: QSAR for antifungal drugs vs. different fungi species. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1–6.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L; HARTMANN-SCHMIDLIN, S.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M; MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K; OKSMAN-CALDENTY, K.M. (2005) Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. **98**:991-1000.

RAMESHKUMAR, N.; VEENA, A.; LAVARASAN, R.; ADIRAJ, M.; SHANMUGAPANDIYAN, P.; SRIDHARA, S.K. (2003) Syntesis and biological

activities of 2,6-Diaryl-3-methyl-4-piperidone derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **26**, 188-193.

RUEPING, M.J., VEHRESCHILD, J.J.; CORNELLY, O.A. (2009) Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **18**:735-748.

SALGIN-GÖKSEN, U., GÖKHAN-KELEKÇİ, N., GÖKTAS, O., KÖYSAL, Y., KILIÇ, E., ISIK, S., AKTAY, G., ÖZALP, M. (2007) 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**:5738-5751.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. (2008) Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, eCAM*, 1-12.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. (2008a) Effect of *Brazilian copaiba* oils on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **120**:204-208.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. (2008b) In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **103**:277-281.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. (2008) Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, **163**, 337-344.

SHIGEMORI, H.; KOBAYASHI, J. (2004) Biological activity and chemistry of taxoids from the Japanese yew, *Taxus cuspidata*. *Journal of Natural Products*, **67**:245–256.

SILVA, C. C.; ALMAGRO, V.; MARSALOLI, A. J. (1993) A direct route to terpene isothiocyanates. *Tetrahedron Letters*, **34**:6717-6720.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. (2004) Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**:135-143.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. (2005) Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents Chemoterapy*, **49**:176-182.

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. **21**:606-625.

TRUITI, M.C.T.; SARRAGIOTTO, M.H.; ABREU FILHO, B.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. (2003) *In vitro* antibacterial activity of a 7-O-beta-D-glucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**,283-287.

TSAI, C.C.; WANG, C.C.; KUO, H.Y.; CHIANG, D.H.; LIN, M.L.; LIU, C.Y.; YANG, S.P. (2008) Adult candidemia at a medical center in northern Taiwan: a retrospective study. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **41**:14-21

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; KOREHISA MAZA, P.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; ALVIANO, D.S.; ROSA, MDO S.; LOPES, A.H.; ALVIANO, C.S.; NAKAMURA, C.V. (2006) Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, **55**:99-105.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, **16**:97-110.

WANG, P.; KONG, C.H.; ZHANG, C.X. (2006) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L. *Molecules*, **11**, 549-555.

CAPÍTULO II

Dois trabalhos compõem a presente tese de doutorado, com objetivo de avaliar atividade antifúngica de um produto natural no primeiro trabalho e no segundo trabalho, avaliar o efeito antifúngico em derivados semi-sintéticos:

Artigo 1 submetido segundo o título:

Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae) **Mirian Ueda Yamaguchi, Francielle Pelegrin Garcia, Diógenes Aparício Garcia Cortez, Tânia Ueda-Nakamura; Benedito Prado Dias Filho, Celso Vataru Nakamura** (2009). Submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*.

Artigo 2 publicado segundo o título:

Effects of thiosemicarbazide camphene derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. **Mirian Ueda Yamaguchi, Ana Paula Barbosa da Silva, Tânia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Cleuza Conceição da Silva e Celso Vataru Nakamura** (2009) *Molecules*, **14**:1796-1807.

Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae)

Mirian Ueda Yamaguchi¹; Francielle Pelegrin Garcia¹, Diógenes Aparício Garcia
Cortez¹; Tânia Ueda-Nakamura^{1,2}; Benedito Prado Dias Filho^{1,2};
Celso Vataru Nakamura^{*1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, PR Brazil

²Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR Brazil.

*Corresponding author:

Tel: +55 44 3261-1397; Fax: +55 44 3261-4860; e-mail: cvnakamura@uem.br

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Ocotea odorifera* is a medicinal plant, popularly known in Brazil as “canela-sassafrás”, and used to treat dermatosis.

Aims of study: This study investigated the antifungal properties of *O. odorifera*.

Materials and methods: The methanolic extract of *O. odorifera* was submitted to successive chromatographic separation and yielded Tellimagrandin II (TEL). The *Candida parapsilosis* ATCC 22019 strain was used to determine the minimal inhibitory and fungicidal concentrations (MIC and MFC), to study the synergistic action with nystatin (NYS), amphotericin (AMP), and fluconazole (FLU), and post-treatment morphological analysis was done by scanning electron microscopy (SEM). Cytotoxicity in Vero cells and genotoxicity by the micronucleus test were assessed.

Results: The TEL structure was proposed based on NMR and comparison with literature data and ESI-MSMS analysis. The compound showed potent inhibitory activity against *C. parapsilosis*, with a MIC of 1.6 μ M. TEL acted synergistically with NYS, AMP, and FLU, and as observed by scanning electron microscopy (SEM), caused morphological alterations in the yeast cells. The methanolic extract showed low cytotoxicity in vitro and in vivo, and was not mutagenic in mice ($p < 0.05$).

Conclusion: The use of *O. odorifera* in traditional medicine seems to have a valid basis, in view of the antifungal activity of Tellimagrandin II demonstrated in this study, and may contribute to potential drug development.

Key words: Ellagytannin, Tellimagrandin II, *Ocotea odorifera*, antifungal activity, *Candida parapsilosis*, genotoxicity.

1. Introduction

In Brazil, the diverse plant fauna is estimated to include 120,000 species. In popular culture, strongly influenced by indigenous peoples, many plants are utilised for medicinal purposes. The successful and wide utilisation of plant material in medicinal infusions and other common homemade preparations, may be associated with the tropical climate, which allows the chemical constituents to be distributed in all parts of the plant (leaf, flower, fruit, branch, and root), which makes it easy and uncomplicated to prepare them in water. This may reflect the polarity of many substances that are involved in ethnopharmacologically active compounds, such as tannin, saponin, glycoside, and flavonoid glycosides (Mendes and Carlini, 2007).

The Brazilian tropical climate is ideal for the abundant growth of many plants, and also very suitable for many kinds of fungi and bacteria. Accordingly, the majority of plants of these habitats contain secondary metabolites to protect themselves against harmful microorganisms (Boer et al., 2005), which makes them ideal for research on new molecules with antimicrobial activity.

Ocotea is the largest genus of the family Lauraceae, with nearly 350 species occurring in the neotropics, of which 160 are found in Brazil (Baitello, 2001). Some species are used in traditional medicine, including *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, which is popularly known by its vernacular names: “sassafrás”, “canela de sassafrás”, “Sassafrás do Brasil”, and “Brazilian sassafras”. *Ocotea odorifera* was mentioned in the Flora Medicinal literature, dating from 1853, by Theodore Peckolt for popular use in dermatoses and syphilis, and is used by the Guarani Indians to treat fever and malaria (Peckolt and Peckolt, 1853; Souza et al., 2004).

An example of the obvious necessity for new antimicrobial agents is the species of *Candida*, which are now a major cause of healthcare-related bloodstream and invasive

infections. The frequency of nosocomial bloodstream infections by *Candida non-albicans* species such as *C. parapsilosis* has risen dramatically in the past decade, mainly in immunocompromised patients. The increase in fungal infections is accompanied by significant increases in the length of hospital stays and mortality. This situation amply justifies the present study to evaluate the antifungal property of dried leaves from *O. odorifera*.

Traditional medicinal plants have been the source of innumerable phytochemical molecules with antimicrobial activity *in vitro*, but in order to be therapeutically useful, a substance must inhibit the infecting microorganism and exhibit greater selective toxicity towards it than towards the host cell (Craig, 1998). Contradicting the concept that natural substances or homemade medicines are inoffensive to the host, several studies have reported plant extracts that are responsible for DNA damage, showing genotoxicity and mutagenicity, suggesting that their use must be thoroughly evaluated (Vilar et al., 2008). Based on these aspects, we included in this study, the *in vitro* cytotoxicity assay in the Vero cell line, and the micronucleus test, *in vivo*, with rodent hematopoietic cells, which has been widely and frequently used to detect induction of chromosomal aberration.

2. Materials and methods

2.1. General procedure

¹H and ¹³C NMR spectroscopic experiments were recorded on a MERCURY PLUS spectrometer using deuterated solvent and TMS as the internal standard. Low-resolution ESI-MSMS data were acquired in the negative ion mode, using a Micromass Quattro-LC instrument equipped with an ESI/APCI Z-spray ion source. CC: silica gel 60 (70—230 and 230—400 mesh); TLC: silica gel plates F₂₅₄ (0.5 mm in thickness) (E. Merck, Darmstadt, Germany); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

2.2. Plant material

Leaves of *O. odorifera* (Vell.) Rohwer were collected in Monte Formoso, Minas Gerais, Brazil, in January 2005, after 3 sunny days. The leaves were dried in shade, identified through morphological analysis, and deposited (voucher specimen no. HUM 11,560) in the Herbarium of the State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

2.3. Extraction and isolation procedures

Dried leaves of *O. odorifera* (Vell.) Rohwer (978.2 g) were cut into small pieces and placed in a powder mill. Powdered leaves were extracted at room temperature with ethanol:water (9:1), under agitation, for 3 days. The hydroalcoholic extract was filtered until completely drained of the residue, evaporated under vacuum at 45 °C, and lyophilised. The crude extract yielded 162.14 g, and 10.0 g was separated and subjected to column chromatography on silica gel (180 g) and eluted in sequence with hexane (1 L), chloroform (1 L), chloroform/ethyl acetate (1:1; 2 L), ethyl acetate (2 L), methanol (1 L), and methanol/water (9:1; 1 L). This procedure resulted in 6 fractions, which were lyophilised and denominated, respectively, F1 (0.11 g), F2 (0.62 g), F3 (0.66 g), F4 (0.53 g), F5 (7.75 g), and F6 (0.28 g). The crude extract and the six fractions were assayed for antifungal activity. The methanolic fraction (F5) showed the strongest antifungal activity; therefore, 2.03 g of F5 was subjected to column chromatography on Sephadex[®] LH-20 (75 g; ϕ = 21 mm, Pharmacia) eluted with 10% methanol in water, which yielded 145 sub-fractions.

The crude extract obtained from *O. odorifera* dried leaves, the fractions F1, F2, F3, F4, F5, F6, and the 145 sub-fractions obtained from F5 were analysed by preparative TLC, using silica gel GF₂₅₄ as the stationary phase, ethyl acetate:formic acid:water (90:5:5) as the mobile phase, and Godin's reagent as the chromogenic agent (Rocha et al., 1995). The 145 sub-fractions were combined according to the subsequent TLC analysis and were assayed for antifungal activity. The TCL process allowed us to distinguish a distinct red

spot on the start line on the TLC-plates, starting from fraction F72 until F145, for which the MIC assays showed marked antifungal property.

The assembled fractions (F72 to F145) were subjected to a Lobar® 240-10 LiChroprep RP-18 (40-63 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) eluted with methanol:water (1:1). This procedure allowed the isolation of a pure compound (23.4 mg), which was identified and its structure established by spectroscopic analysis of ¹H, ¹³C-NMR, H-H COSY, DEPT, HMQC, HMBC, and ESI MS/MS, and by comparison with literature data (Wilkins and Bohm, 1976; Niemetz and Gross, 2003).

2.4. Biological activity

2.4.1. Strain and growth conditions

Candida parapsilosis ATCC 22019 was maintained on Sabouraud dextrose agar. Inocula were grown overnight in Sabouraud dextrose broth, at 36 °C. The concentration of yeast cells was determined by haemocytometer counts.

2.4.2. Fungal inhibitory activity:

Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by at least three experiments performed in duplicate, using the broth microdilution procedure, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A2, 2005). The test compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and further dilutions were prepared in 0.85% sterile saline. Suspension of 10⁴ yeasts/mL were added into each well and cultivated in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich Chemical Co., Missouri, USA, 8.6 g/L), after 48 h incubation, at 36 °C, the minimum inhibitory concentration was determined as the lowest concentration of the compound that inhibited visible growth of the fungus.

2.4.3. Fungicidal activity:

The minimal fungicidal concentrations (MFCs) of the compounds were obtained by a subculture of 10 μ L from minimum inhibitory concentration wells, without visible growth, placed in Petri dishes containing Dextrose Sabouraud Agar medium. After incubation for 48 h at 36 °C, the minimum fungicidal concentration was determined by the lowest concentration without fungus growth.

2.5. Determination of the cytotoxic activity

Vero cells were maintained as a monolayer culture on 96-well microtitre plates. A suspension of 10^5 Vero cells/mL was added into each well, in DMEM medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA), and different concentrations of TEL were applied to the cell monolayer in duplicate. After 72 h of incubation, at 37 °C with 5% CO₂, the cell growth was evaluated by sulforhodamine B assay. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a negative control. Data were calculated as the percentage of inhibition. The concentration of 50% cytotoxicity (CC₅₀) was defined as the concentration which reduced the OD₅₃₀ of treated cells to 50% of that of untreated cells (Luize et al., 2006). The results are the means of two determinations from three independent experiments.

2.6. Checkerboard microdilution assay

The interaction between TEL and the antifungal drugs nystatin (NYS; Cristália, São Paulo, Brazil), amphotericin B (AMP; Cristália, São Paulo, Brazil), and fluconazole (FLU; Pfizer, São Paulo, Brazil) against the *C. parapsilosis* strain was tested by a microdilution checkerboard technique (Johnson et al., 2004). Serial two-fold dilutions of TEL and the antifungals NYS, AMP, and FLU, were prepared on each plate containing a unique

combination of two agents (TEL-NYS, TEL-AMP, and TEL-FLU). The concentrations were chosen to encompass the MIC for the *C. parapsilosis* strain to be tested. The range was 0.09-6.25 µg/mL for NYS, AMP, and FLU. Microplates were inoculated with 10⁴ yeast cells/mL from overnight culture. After 24 h incubation at 36 °C, the plates were examined and the fractional inhibitory concentration (FIC) indexes were calculated as follows: FIC index = (MIC of TEL in combination)/(MIC of TEL alone) + (MIC of NYS or AMP or FLU in combination)/(MIC of NYS or AMP or FLU alone). Synergism and antagonism were defined by FIC indexes of ≤ 0.5 and ≥ 4, respectively. A result for the FIC index of >0.5 but ≤4 was considered indifferent (Odds, 2003). The result was considered final when two coincident results were obtained.

2.7. Micronucleus test

This study was conducted according to international guidelines for testing chemicals OECD no. 425 (2001). The methodology was performed as described by Schmid (1975), and the experimental protocol was approved by the local Ethics Committee (voucher no. 067/2007) of the State University of Maringá. Female Swiss albino mice at 8-12 weeks of age were obtained from the Central Animal House of the State University of Maringá. The mice were housed in cages, 6 animals per cage at 25 °C, 12 h light/dark cycle and 30-70% relative humidity. Food (appropriate commercial ration) and water were given *ad libitum*. The animals were maintained for a minimum of 5 days for acclimatisation. In order to assess the genotoxicity of F5 in mice, 2,000 mg F5/kg body weight (bw) suspended in 1% aqueous DMSO was administered by oral gavage. Three groups of 6 animals were treated once orally by gavage at a volume of 10 mL/Kg bw. The groups were: animals treated with F5, animals treated with 40 mg/Kg bw of cyclophosphamide (positive control), and animals treated with 1% DMSO (negative control). Animals were killed 24 h after treatment, and bone marrow was sampled from

both femora of each animal. The epiphyses were cut off, and the bone marrow was flushed out of the diaphysis into Eppendorf tubes, and completed with fetal bovine serum (FBS; 37 °C; about 2 mL per femur). After mixing, the suspension was centrifuged at 1,500 rpm for 5 min, the resulting supernatant was discarded, and the sediment was re-suspended and dropped onto slides, where smears were prepared, air-dried, and stained with May-Grunwald Giemsa solution. Before microscope analysis, the slides were coded and the evaluation was blinded. For each animal, 2,000 polychromatic erythrocytes were scored and evaluated for the presence of a micronucleus.

2.8. Scanning electron microscopy (SEM):

Candida parapsilosis was incubated in RPMI 1640 medium for 24 h at 36 °C with TEL, at 3.3 µM. A negative control was carried out simultaneously. The tubes were centrifuged, and the pellets washed twice with PBS (pH 7.2). The pellets were fixed with 2.5% glutaraldehyde and placed on cover slips (3 x 3 mm²) treated with poly-L-lysine. The cover slips were washed three times in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer and dehydrated in a graded ethanol series, critical-point dried, sputter-coated with gold, and assessed by means of a scanning electron microscope (Shimadzu SS 550).

3. Results and Discussion

Ellagitannin is a complex plant polyphenol composed of hexahydroxydiphenyl moieties esterified to a sugar. These secondary metabolites have been isolated from fruits, leaves, and roots of several plant species, and have been intensively studied for their antimicrobial activity (Funatogawa et al., 2004; Puupponen-Pimiä et al., 2005; Reddy et al., 2007). In this study, TEL (Fig.1), which belongs to the ellagitannin class, was isolated from *O. odorifera* leaves, after the crude extract and the methanolic extract (F5) showed antifungal activity.

The TEL from leaves of *O. odorifera* was also characterised by the ESI-MSMS in the negative ion mode. Mass-spectrometric analysis revealed a molecular anion of TEL at m/z 937; this ion eliminated a galloyl group unit, resulting in a product ion of m/z 785, which was subsequently fragmented, giving a fragment of m/z 301. The anion m/z 785 eliminated a second galloyl group, revealing the presence of galloyl-HHDP-glucopyranose (m/z 633) as the mass spectra reported by Salminen et al. (1999).

The MICs of the crude extract and F5 against *C. parapsilosis* were 12.5 $\mu\text{g/mL}$, and the same value was obtained for both extracts. The purified ellagitannin compound, TEL, showed a stronger effect against *C. parapsilosis* with MIC = 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (1.6 μM); however, the minimum fungicidal concentration was MFC > 100 $\mu\text{g/mL}$ for all. F5 showed less activity against *C. albicans* ATCC 10231 and *C. tropicalis* ATCC 28707 (data not shown).

Ellagitannins are hydrolysable tannins, compounds in which gallic acid is attached via an ester bond to a D-glucose core. These compounds are well described because of their antimicrobial activity. Several studies have examined their properties. Ellagitannins have often been implicated in the durability of woods. According to Scalbert (1992), durable eucalyptus and oak heartwoods are rich in hydrolysable tannins, and antifungal activity has been reported. The durability of hardwoods such as oaks and chestnuts is thought to owe much to the deposition of ellagitannins. Resistance to fungal invasion is due to the ability of the tannins to precipitate protein and/or remove metal cofactors through their strong affinity for metal ions, acting as a microbial barrier (Mila and Scalbert, 1996; Helm et al., 1997).

Berries have received attention recently because of the purported health benefits in juices and other foods (jelly, fresh and frozen fruit), and they are also rich in hydrolysable tannins. Ellagitannins and their antimicrobial properties are well documented to act against human intestinal pathogens, inhibiting the growth of species of *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, and *Campylobacter*, and also against

C. albicans (Puupponen-Pimiä et al., 2005; Noynek et al., 2006; Alakomi et al., 2007; Hager et al., 2008). Funatogawa and cols. (2004) examined and demonstrated the antibacterial action of several hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*, and reported MICs ranging from 6.2 to 12.5 µg/mL by TEL.

A survey of the literature revealed that TEL has been isolated from several plant species (Dong et al., 1998; Leu et al., 2002; Niemetz, 2003; Shimoda et al., 2008). Different activities have been reported, including antitumour activity tested in mice (Miyamoto et al., 1993) and potent anticoagulant activity by significantly prolonging the clotting of rabbit plasma (Dong et al., 1998). In the present study, TEL has been isolated for the first time from *O. odorifera*, the medicinal plant popularly known in Brazil as “canela-sassafrás”, and its antifungal property has been demonstrated.

In our study, TEL showed significant inhibition of *C. parapsilosis* with MIC_{TEL} of 1.6 µM. For the same strain, the inhibition detected with NYS and AMP showed MIC_{NYS} of 0.8 µM and MIC_{AMP} of 0.4 µM, respectively. On the other hand, TEL showed a better value of MIC than FLU, which had MIC_{FLU} of 10.2 µM.

Over the last few years, the incidence of *C. albicans* has declined in proportion to that of non-*albicans* strains, predominantly *C. parapsilosis* (Celebi et al., 2008; Trofa et al., 2008; Anunnatsiri et al., 2009), which show a higher level of drug resistance (Malafiej et al., 2009). The drug resistance of *Candida* strains and special conditions of patients (tertiary, neonatal, oncology, HIV, transplant) have stimulated the study of interactive effects between antifungal drugs, which are often indicated to obtain better therapeutic efficacy. A checkerboard microdilution assay performed between TEL combined with NYS, AMP, and FLU against *C. parapsilosis* resulted in synergic effects of all the combinations. The FIC indexes were 0.30, 0.28, and 0.38, for TEL-NYS, TEL-AMP, and TEL-FLU, respectively. The isobolograms (Fig. 2) showed Tellimagrandin II acting synergistically *in*

vitro with a common antifungal, and these results led us to perform cytotoxicity and genotoxicity assays.

In our study, the methanolic extract F5 showed low cytotoxicity to Vero cells *in vitro*, with a CC₅₀ of 51 µg/mL. The toxicity for Vero cells and the activity against the yeasts were compared by using the selectivity index (SI) ratio (CC₅₀ for Vero cells/MIC for *C. parapsilosis*). A value greater than 1 is considered more selective for activity against yeasts, and a value less than 1 is considered more selective for activity against Vero cells (Tiuman et al., 2005). TEL was more selective against the yeasts than the mammalian cells, with an SI ratio of 4.1. In another study, Funatogawa (2004) demonstrated that several hydrolysable tannins, including TEL, isolated from different medicinal plants were all non-cytotoxic when tested *in vitro* against human gastric cancer MKN-28 cells.

The results of the *in vivo* genotoxicity test demonstrated that the *O. odorifera* F5 methanolic extract is not mutagenic under the micronucleus test experimental conditions (Table 1). Negative and positive controls were included in the test and produced the expected results, demonstrating the validity of the assay.

SEM observation (Fig. 3) confirmed the antifungal activity of TEL, revealing clear morphological alterations of the yeast (C). Damage and loss of integrity of the *C. parapsilosis* cell wall were observed (D), after treatment with TEL at a concentration of 3.2 µM on Sabouraud dextrose broth, for 24 h, at 36 °C.

Conclusion

Based on the potential of traditional medicine, *O. odorifera* was the target of our study, and the discovery of potent activity against *C. parapsilosis* illustrated the value of ethnopharmacological investigations. Tellimagrandin II was isolated for the first time from *O. odorifera*, and merits further investigation because of its interesting synergistic action in combination with FLU, NYS, and AMP, and the demonstrated morphological alterations of

yeast cells. The methanolic extract F5 displayed low cytotoxicity, selective activity against yeasts over mammalian cells, and has no genotoxic potential. Once more, an ethnopharmacological study has provided a baseline leading to potential drug development.

Acknowledgments

The authors thank Michel Murgu for his kind help with ESI-MSMS analysis. This study was supported through grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and PRONEX/Fundação Araucária.

References

- Alakomi, H.L., Puupponen-Pimiä, R., Aura, A.M., Helander, I.M., Nohynek, L., Oksman-Caldentey, K.M., Saarela, M., 2007. Weakening of *Salmonella* with selected microbial metabolites of berry-derived phenolic compounds and organic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10, 3905-3912.
- Anunnatsiri, S., Chetchotisakd, P., Mootsikapun, P., 2009. Fungemia in non-HIV-infected patients: a five-year review. *International Journal of Infectious Diseases*, 13, 90-96.
- Baitello, J.B., 2001. Novas espécies de *Lauraceae* para a flora brasileira, *Acta Botânica Brasileira*, 15, 445-450.
- Boer, H.J., Kool, A., Broberg, A., Mziray, W.R., Hedberg I., Levenfors, J.J., 2005. Anti-fungal and antibacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 461-469.
- Celebi, S., Hacimustafaoglu, M., Ozdemir, O., Ozkaya, G., 2008. Nosocomial candidaemia in children: results of 9-year study. *Mycoses*, 51, 248-257.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Approved standard M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Pennsylvania, 2005, pp.43.
- Craig, W.A., 1998. Pharmacokinetics/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases*, 26, 1-12.
- Dong, H., Chen, S.X., Kini, R.M., Xu, H.X., 1998. Effects of tannins from *Geum japonicum* on the catalytic activity of thrombin and factor Xa of blood coagulation cascade. *Journal of Natural Products*, 61, 1356-1360.

- Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Hirai, Y., 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology*, 48, 251-261.
- Hager, T. J., Howard, L.R., Liyanage, R., Lay, J. O., Prior, R.L., 2008. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 661-669.
- Helm, R. F., Ranatunga, T.D., Chandra, M., 1997. Lignin-hydrolyzable tannin interactions in wood. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 47, 3100-3106.
- Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.T., Rex, J.H., 2004. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 693-715.
- Leu, E., Krieger-Liszkay, A., Goussias, C., Gross, E.M., 2002. Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiology* 130, 2011-2018.
- Luize, P.S., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., 2006. Activity of neolignans isolated from *Piper regnelli* (MIQ.) C.DC.var.pallescens (C.DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 10, 2126-2130.
- Małafiej, E., Adamiec, A.C., Tworzyńska, U., 2009. Microbial profile and drug resistance of *Candida* strains isolated from the blood of children: an 11-year study. *Mycoses*, 52, 149-153.

- Mendes, F.R., Carlini, E.A., 2007. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 493-500.
- Mila, I., Scalbert, A., Expert, D., 1996. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry* 42, 1551-1555.
- Miyamoto, K., Murayama, T., Nomura, M., Hatano, T., Yoshida, T., Furukawa, T., Koshiura, R., Okuda, T., 1993. Antitumor activity and interleukin-1 induction by tannins. *Anticancer Research*, 13, 37-42.
- Niemetz, R., Gross, G.G., 2003. Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. *Phytochemistry*, 62, 301-306.
- Nohynek, L.J., Alakomi, H.L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.M., Puupponen-Pimiä, R., 2006. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54, 18-32.
- Odds, F.C., 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 1-5.
- OECD Organization for Economic Co-operation and Development, Guideline for testing of chemicals – Mammalian erythrocyte micronucleus test, update test guideline 474, Paris, 1997, France.
- Peckolt, G., Peckolt, T., 1853. *História das plantas medicinais e úteis do Brasil*, Companhia Typographica do Brasil, Rio de Janeiro, pp. 281-282.

- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.L., Oksman-Caldentey, K.M., 2005. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *Biofactors*, 23, 243-251.
- Reddy, M.K., Gupta, S.K., Jacob, M.R, Khan, S.I., Ferreira, D., 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73, 461-467.
- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M.A.C., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K., 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40, 1447-1452.
- Salminen, J.P., Ossipov, V., Lojonen, J., Haukioja, E., Pihlaja, K., 1999. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 864, 283-291.
- Scalbert, A., 1992. Tannins in woods and their contribution to microbial decay prevention. In *Plant Polyphenols*; Hemingway, R.W., Laks, P.E. Plenum Press: New York; pp. 935-952.
- Schimid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- Shimoda, H., Tanaka, J., Kikuchi, M., Fukuda, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., 2008. Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and d-galactosamine: hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4444-4449.

- Souza, G.C., Haas, A.P.S, von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 135-143.
- Tiuman, T.S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D.A., Dias Filho, B.P., Morgado-Díaz, J.A., de Souza, W., Nakamura, C.V., 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 176-182.
- Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D., 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 606-625.
- Vilar, J.B., Ferreira, F.L., Ferri, P.H., Guillo, L.A., Chen Chen, L., 2008. Assessment of mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart.1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 141-147.
- Wilkins, C.K., Bohm, B.A., 1976. Ellagitannins from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry*, 15, 211-214.

Table 1. Incidence of micronucleus (MNs) in mouse bone marrow 24 h after treatment by gavage

Treatment	Number of animals	MNs/2000 erythrocytes Individual animal data	Group mean (±SD)
F5 <i>O.odorifera</i> extract (2000 mg Kg ⁻¹ bw)	6	2,5,4,2,3,1	2.8*(±1.5)
Cyclophosphamide (40 mg Kg ⁻¹ bw) Positive control	6	34,24,24,27,23,30	27.0(±4.3)
DMSO (1%) Negative control	6	1,1,4,3,2,4	2.5(±1.4)

*P < 0.05 (Kruskal-Wallis ANOVA) significantly different from positive control

FIGURE 1

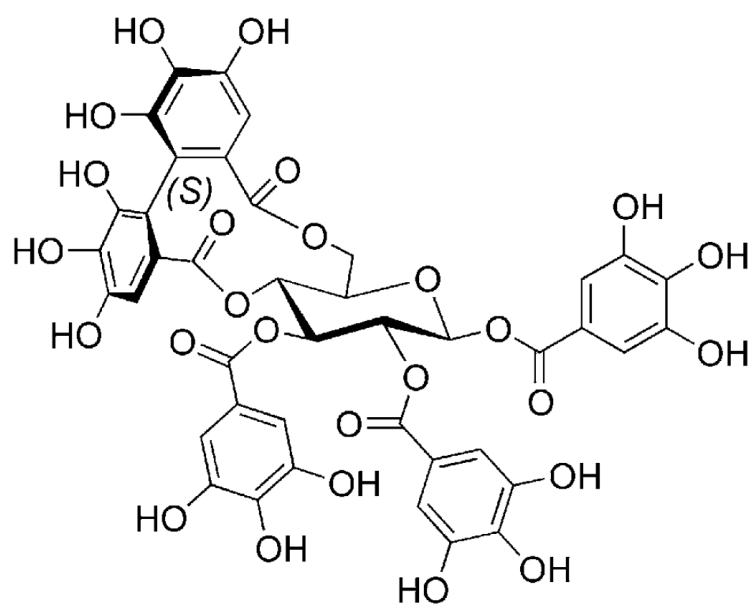


FIGURE 2

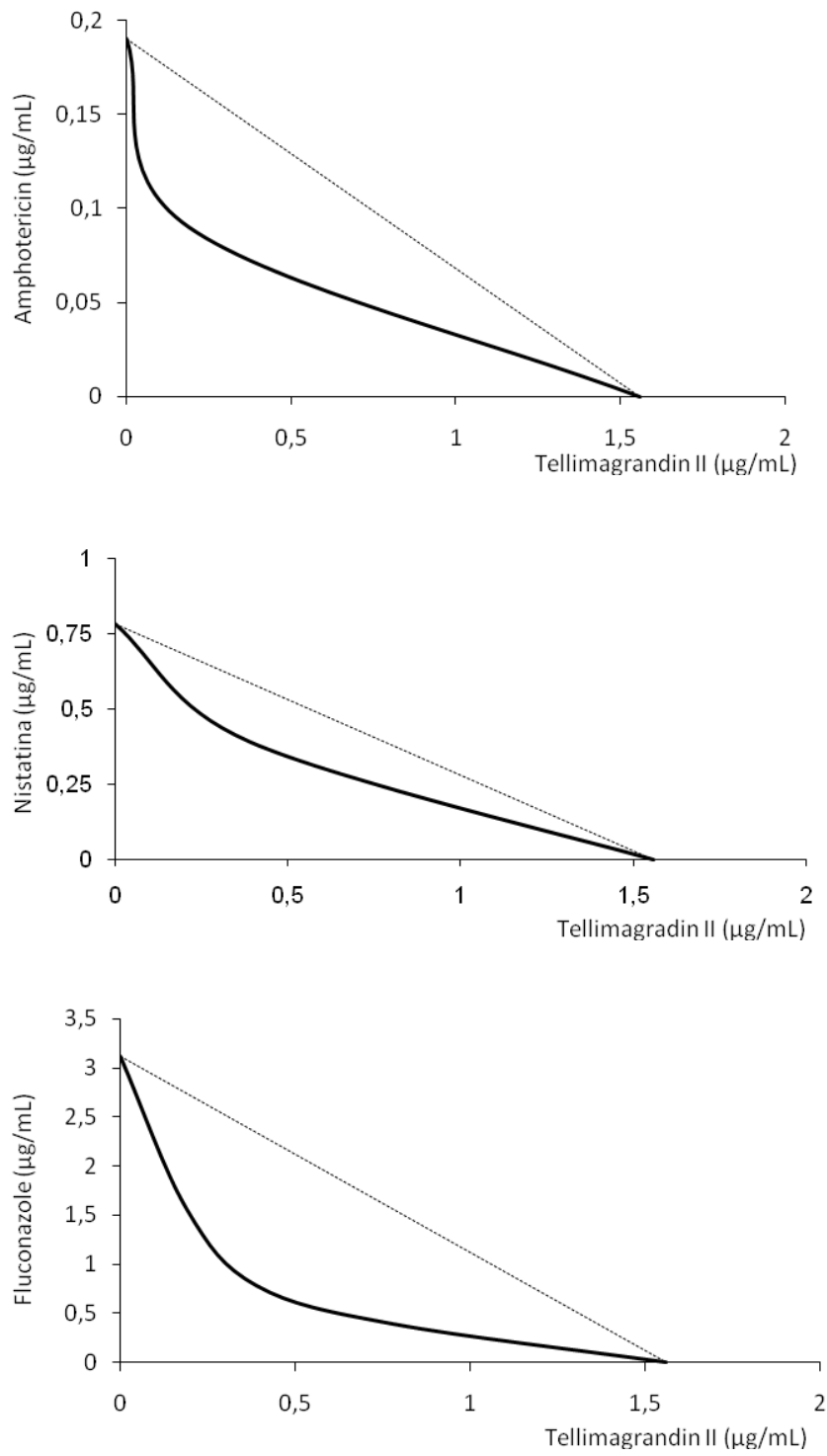
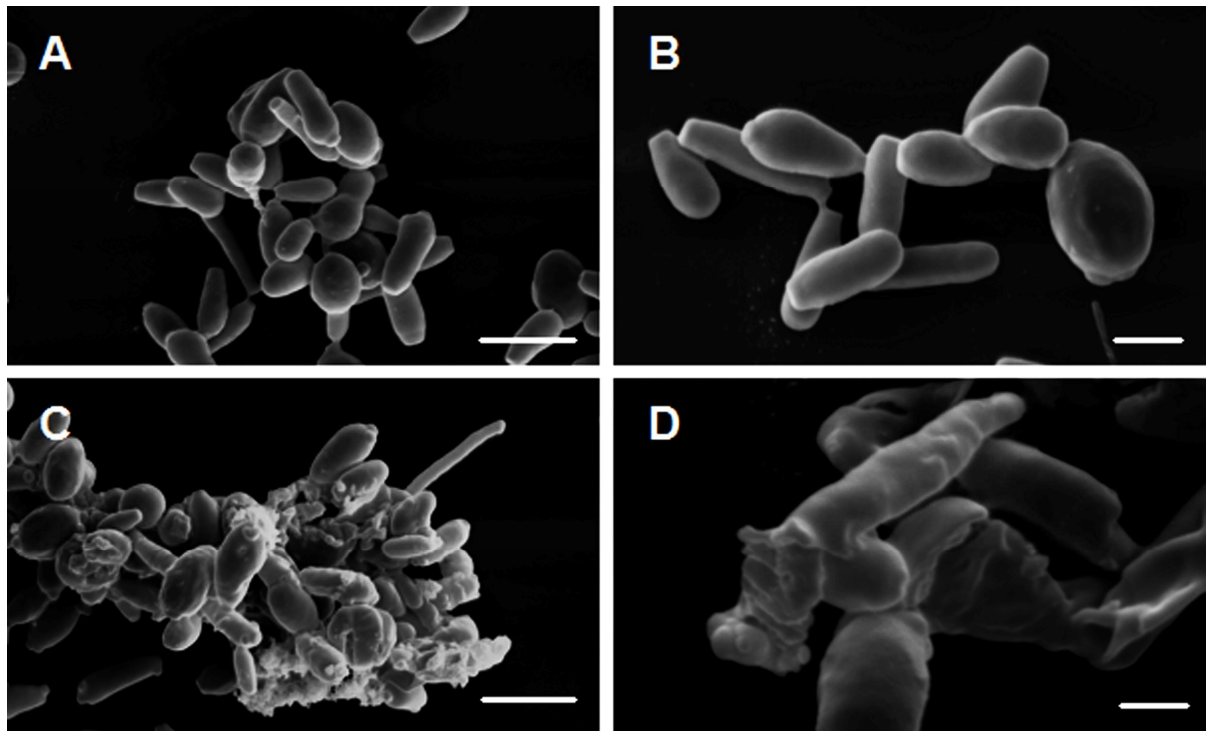


FIGURE 3



Legends for Figures

Figure 1. Chemical structure of Tellimagrandin II

Figure 2. Synergistic inhibition of *C. parapsilosis* strain by TEL-AMP, TEL-NYS, and TEL-FLU combinations analysed by isobologram

Figure 3. Scanning-electron microscopy of *C. parapsilosis* cultured for 24 h, at 36 °C: (A-B) Control, (C-D) treatment with Tellimagrandin I

Article

Effects of a Thiosemicarbazide Camphene Derivative on *Trichophyton mentagrophytes*

Mirian Ueda Yamaguchi ^{1,*}, Ana Paula Barbosa da Silva ², Tânia Ueda-Nakamura ^{1,3}, Benedito Prado Dias Filho ^{1,3}, Cleuza Conceição da Silva ² and Celso Vataru Nakamura ^{1,3,*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil; E-mails: mirianuy@irapida.com.br (M-U.Y.), tunakamura@uem.br (T-U.N.), bpdfilho@uem.br (B-D.F.), cvnakamura@uem.br (C-V.N.)

² Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil; E-mails: silvaapb@yahoo.com.br (A-B.S.), ccsilva@uem.br (C-C.S.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: cvnakamura@uem.br; Tel: +55 44 3261 1397; Fax: +55 44 3261 4860.

Received: 24 March 2009; in revised form: 6 May 2009 / Accepted: 7 May 2009 /

Published: 13 May 2009

Abstract: Thiosemicarbazides are compounds known for their biological activity, particularly their antimicrobial properties, which include activity against fungi. The difficulty of treating fungal diseases induced us to assess the antifungal properties of some novel thiosemicarbazide compounds. We selected the natural products limonene and camphene as sources for the preparation of these new thiosemicarbazide derivatives. The compound *N*(4)-[2,2-dimethyl-3-methylnorbornane]-thiosemicarbazide (**TIO C**) showed an antifungal effect on *Trichophyton mentagrophytes*, with values of MIC = 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and MFC = 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Scanning-electron microscopy showed a decrease in mycelium development and morphological alterations of *T. mentagrophytes* cultured on nail fragments and treated with **TIO C**. In an attempt to discover its mode of action, we noted that ergosterol is apparently not a target of **TIO C** activity. An effect of **TIO C** on *T. mentagrophytes* cell walls and dividing cross-walls was shown by observed impairment of the fluorescence of tissues stained with calcofluor white, a specific marker for fungal chitin, suggesting that the compound can affect and damage the cell-wall structure or may interfere with its formation, during cell division, growth, and morphogenesis. This approach to the synthesis of new derivatives might provide interesting compounds with greater biological activity in pharmacological research.

Keywords: antifungal activity; thiosemicarbazide; camphene; *Trichophyton mentagrophytes*

Introduction

Dermatophyte fungi are common pathogens that require keratin for growth, and invade keratinous tissues. Members of the genus *Trichophyton* are among the dermatophytes that are most often implicated in superficial cutaneous infections. The species *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* are responsible for about 90% of chronic dermatophyte infections, showing a common pattern of association with tinea cruris, tinea pedis, tinea manuum, tinea barbae, and onychomycosis [1-5]. *T. rubrum* is the most prevalent dermatophyte species isolated from nails, followed by *T. mentagrophytes*; it is also frequently the etiological agent of tinea pedis (athlete's foot) [4], and has demonstrated elevated resistance to commercial antifungal drugs [5,6]. The number of people affected by dermatophytes in the last three decades has increased; the reasons for this increase include the aging population, increased numbers of immunocompromised patients (transplants, HIV), diabetes, and other circumstances that affect the immunity of the general population [7-9].

Dermatophytosis is a nonfatal condition, but is difficult to eradicate, often necessitating long-term treatment. Although the antifungal agents ketoconazole, griseofulvin and, more recently, allylamines and triazoles have been used to treat dermatomycoses, resistance to the different drugs appears very frequently. This is mainly because different tinea (produced by diverse etiological agents) tend to be empirically treated with the same drugs [4] and as a consequence the dermatomycoses tend to persist, greatly diminishing the quality of life of persons suffering from these infections [10]. Since one of the strategies for avoiding the appearance of antifungal resistance is the treatment of fungal infection with the appropriate antifungal agent when the etiological agent is known, new antifungal agents that selectively inhibit a single fungal species are urgently needed, and will help to overcome the above problems [11].

In the search of powerful antimicrobial agents, the biological activity of thiosemicarbazide compounds has been investigated, and they have usually shown inhibitory activity against some species of bacteria, fungi, and protozoa [12]. The attention to thiosemicarbazide derivatives is justified because *in vitro* biological evaluation indicates that these derivatives have antitrypanosomal, antimalarial, and antiamoebic activity in non-cytotoxic concentrations to mammalian cells [13,14].

Compounds that are potentially useful due to their pharmacological properties have often been used as chiral starting materials for the enantioselective synthesis of biologically active derivatives. Among the huge diversity of chemical structures found in nature, the large monoterpene family has provided many examples of renewable natural products that meet the criteria of non-toxicity, high enantiopurity, and low cost required for new drug candidates. In this study, aiming at discovering structures endowed with antifungal activity, we selected *R*-(+)-limonene and (-)-camphene as sources for preparation of new thiosemicarbazides.

In recent years, several thiosemicarbazide derivatives have been synthesised and their biological activities have been explored [15], but few experimental data about their mechanisms of action have been reported. The present study sought to investigate the antifungal activity and to understand the

inhibitory mechanism of a novel thiosemicarbazide derivative, the compound *N*(4)-[2,2-dimethyl-3-methylnorbornane]-thiosemicarbazide (**TIO C**), against *T. mentagrophytes*.

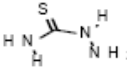
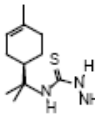
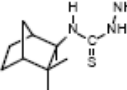
Results and Discussion

Relationship between the antifungal activity and chemical structure of thiosemicarbazides

Thiosemicarbazide derivatives are reported to show biological activity, including antibacterial, antifungal, anti-HIV, analgesic, anti-inflammatory, and anti-tumour effects [16–22]. In turn, the natural products limonene and camphene have been reported to possess biological activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria [23–26]. In view of these properties, our study envisaged that the combined effect of some of these compounds might result in increased activity.

The results of antifungal assays showed clear differences among the five compounds analysed (Table 1). The compounds camphene and limonene showed no effect on *T. mentagrophytes* even at the highest concentration tested, 735 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Table 1. Chemical structure and Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimal Fungicidal Concentrations (MFC) of camphene, limonene, and the thiosemicarbazides TIO, TIO C, and TIO L against *T. mentagrophytes*.

Compound Structure		MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Limonene		>735	>735
Camphene		>735	>735
TIO		548	>735
TIO L		110	220
TIO C		55	110

The MIC value of thiosemicarbazide without a substituent group (**TIO**) was $548 \mu\text{mol L}^{-1}$, whereas the MFC was greater than $735 \mu\text{mol L}^{-1}$. The limonene derivative, **TIO L**, showed moderate activity, with MIC and MFC values of $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $220 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The camphene derivative (**TIO C**) showed the strongest effect on *T. mentagrophytes*, with values of MIC $55 \mu\text{mol L}^{-1}$ and MFC $110 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fluconazole was used as the standard drug, and showed MIC $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. The experiment was repeated three times for each compound.

The chemical structural differences observed among the three thiosemicarbazides (**TIO**, **TIO C**, and **TIO L**) are attributed to the character of the substituent group: hydrogen for **TIO**, limonene for **TIO L**, and camphene for **TIO C** (chemical structures are shown in Table 1). Limonene and camphene belong to the same monoterpene class and are highly hydrophobic, and their incorporation into the thiosemicarbazide nucleus tends to significantly increase the hydrophobicity.

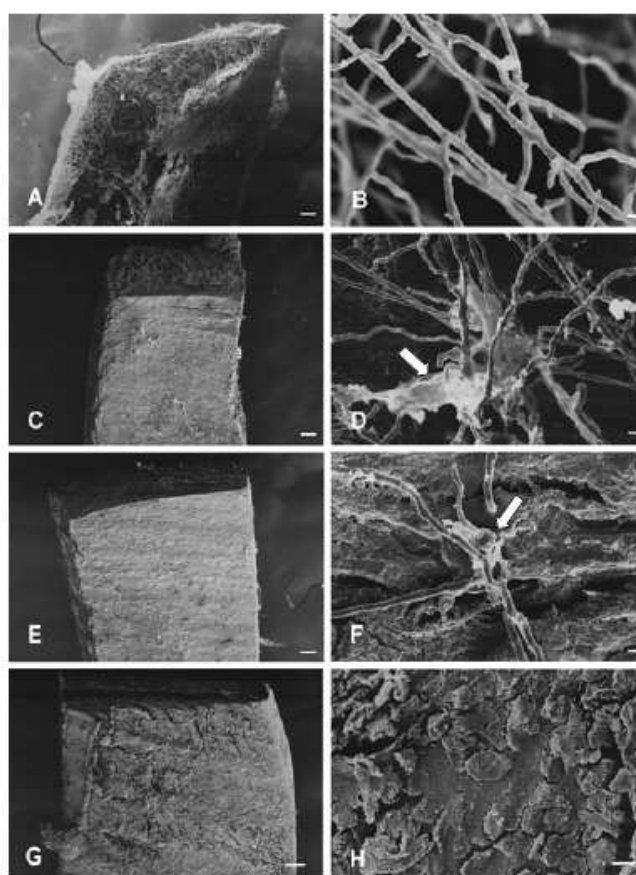
The remarkable antifungal features of **TIO C** and **TIO L** may be due to their more-hydrophobic character, and the absence of the substituent group for **TIO** explains the smaller antifungal effect. A previous report by Maccioni and co-workers [27,28] showed the same relationship between structure and activity in thiazole derivatives, where the stronger lipophilic character probably led to more-effective antifungal derivatives. Another study showed the relationship between the hydrophobic character of a small protein and its antifungal activity, reported by Peng *et al.* [29], who produced mutant genes of a specific seed to obtain a change in the protein-surface hydrophobicity, and showed that a hydrophobic surface is essential to increase the antifungal property.

Effects on hyphae structure and inhibitory activity of TIO C on the invasion of nails

Fungicidal drugs are often preferred over fungistatic drugs for treatment of dermatophytic fungal infections, because fungi recur more often when fungistatic rather than fungicidal drugs are used. The most effective compound appraised in this study (**TIO C**) showed fungistatic action at low doses and fungicidal activity at high concentrations. These effects can be observed in Figure 1, which shows scanning-electron microscopy (SEM) images of *T. mentagrophytes* cultured on nail fragments after treatment with **TIO C**.

Figures 1A and 1B show untreated controls, with abundant growth and normal hyphae structures. The inhibitory effect of **TIO C** at $55 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ concentrations is shown in Figures 1(C,D) and 1(E,F), respectively. In Figures 1D and 1F, arrows indicate excretions of fibrillar materials, and swollen hyphae. The presence of hyphae with swollen portions may reflect a weakening of the cell wall. Microscopy images (Figures 1G, H) show that no mycelia growth was observed on nail scales at $220 \mu\text{mol L}^{-1}$. The results for growth inhibition and morphological alterations were observed in two independent experiments.

Figure 1. Scanning-electron microscopy showing mycelial structures of *T. mentagrophytes* cultured on nail fragments for 72 h, at 28 °C: (A-B) Control, (C-D) Treatment with **TIO C** 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (E-F) Treatment with **TIO C** 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (G-H) Treatment with **TIO C** 220 $\mu\text{mol L}^{-1}$. View of nail fragment in (A) colonised by *T. mentagrophytes*. (C) and (E) show the inhibitory effect of **TIO C** on the invasion of nails. In (D) and (F) arrows indicate excretion of fibrillar materials and swollen structure. Figures (G) and (H) show that no mycelial growth can be seen on nail scales. Bars: 100 μm (A,C,E,G); 10 μm (H); 1 μm (B,D,F).

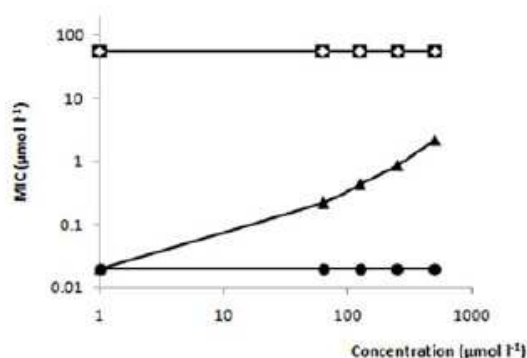


Absence of linkage between ergosterol and **TIO C**

The mode of action of **TIO C** is unknown. Amphotericin B is a well-known membrane-disruptive agent, which has a direct effect on membranes and is lethal to fungi. It forms stable pores in the membrane by complexing with ergosterol, which results in permeability to several ions [30]. In order to test the possibility that **TIO C** might act in a similar manner to amphotericin B, *T. mentagrophytes*

fungus was treated with **TIO C**, and cultured in the presence and absence of exogenous ergosterol [31]. The results demonstrated that in this assay, the same value of MIC ($55 \mu\text{mol L}^{-1}$) was maintained with (Figure 2■), and without ergosterol (Figure 2◇), showing that **TIO C** does not complex with ergosterol, and suggesting that its mode of action is probably by another mechanism or on another target. On the other hand, amphotericin B in the presence of exogenic ergosterol (Figure 2▲) showed MIC enhancement, confirming the mode of action of amphotericin B, by binding to membrane ergosterol. This experiment was carried out in duplicate, in three independent experiments.

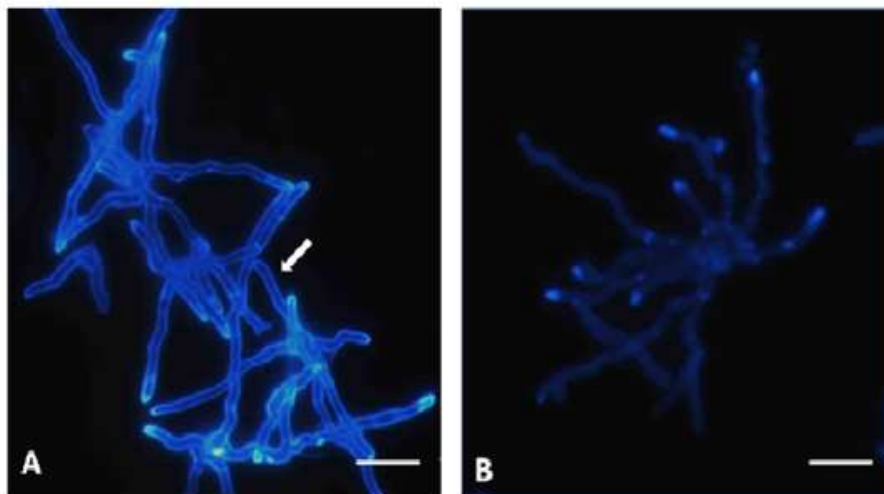
Figure 2. Effect of ergosterol on the MIC of **TIO C** against *T. mentagrophytes*. (■) **TIO C**; (◇) **TIO C** + Ergosterol; (●) Amphotericin B; (▲) Amphotericin B + Ergosterol.



Effects of **TIO C** on cell wall structure

The fungal cell wall is a complex structure that is often composed of chitin, 1,3- β - and 1,6- β -glucan, mannan, proteins, and other polymers, although the wall composition varies markedly among species of fungi [18,32]. The derivative in this study, **TIO C**, showed different activities on other species of fungi (data not shown). **TIO C** does not show fungicidal activity against *Candida albicans* ATCC 10231 or *Microsporium gypseum* ATCC 14683. The activity of **TIO C** on the *T. mentagrophytes* cell wall could be observed by staining with calcofluor white, a marker of fungal chitin. The control, cultured without **TIO C**, exhibited a brighter fluorescence of the fungus cell wall and dividing cross-walls (Fig. 3-A). In contrast, the cell wall of the fungus that had been cultured in the presence of **TIO C** at $55 \mu\text{mol L}^{-1}$ was not detected when stained with calcofluor (Figure 3-B). This suggests that **TIO C** can affect and damage the cell-wall structure or may interfere with its formation, during cell division, growth, and morphogenesis. This possibility merits further investigation.

Figure 3. Immunofluorescence microscopy showing hyphae of *T. mentagrophytes* stained by calcofluor white: (A) Control, arrows indicate intense labelling of the cell wall by calcofluor white; (B) Hyphae after treatment with **TIO C** $55 \mu\text{mol L}^{-1}$ show weak labelling of the cell wall. Bars: $10 \mu\text{m}$.



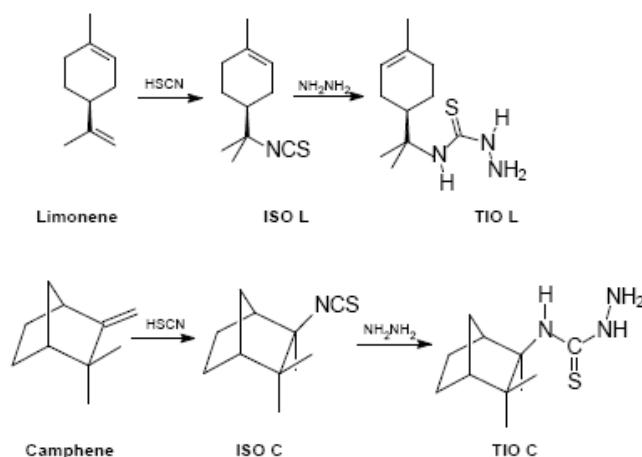
Experimental

General

All melting points were determined using a Microquímica model MQAPF-301 apparatus, and are uncorrected. IR spectra were obtained using KBr pellets in an FT-IR BOMEM spectrophotometer. Low-resolution mass spectra were recorded by means of a Shimadzu-GC/MS model QP 2000A spectrometer at 70 eV equipped with a solids probe. The optical rotations were determined, in a CHCl_3 solution, with a Perkin-Elmer Model 343 polarimeter at 25°C . Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectra were recorded using CDCl_3 as a solvent, at ambient temperature, on a Varian Mercury (300 MHz) instrument with TMS as an internal standard. The chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to TMS. Carbon-13 nuclear magnetic resonance ($^{13}\text{C-NMR}$) spectra were recorded at 75 MHz with the same internal standard.

Synthesis of thiosemicarbazides

The isothiocyanates, 2,2-dimethyl-3-(isothiocyanomethyl) norbornane isothiocyanate (**ISO L**) and *R*-1-methyl-4-(1-isothiocyano-4-isopropyl)-cyclohexene isothiocyanate (**ISO C**) were prepared according to the method of Silva [33], as shown in Scheme 1. A solution of hydrazine (5.15 g, 0.0491 mol) was dissolved in ethanol (25 mL), and then the isothiocyanomonoterpene (9.57 g, 0.0491 mol) was added. The mixture was stirred for 5 h at 90°C , extracted with CHCl_3 , and washed with hexane.

Scheme 1. Synthetic routes for the thiosemicarbazides **TIO L** and **TIO C**.

N(4)-[*R*-(1-Methyl-4-isopropylcyclohexene)]-thiosemicarbazide (**TIO L**): White crystals; yield 85%; mp. 125–127 °C; $[\alpha]_D^{+24}$; IR (KBr): (NH) 3370, (C=S) 1504; EI-MS m/z 227 (M^+); $^1\text{H-NMR}$: δ 5.36 (1H, brs, H-2), 1.83–1.98 (2H, m, H-3), 2.56 (1H, m, H-4), 1.75–1.79 (2H, m, H-5), 1.92–2.05 (2H, m, H-6), 1.50 (3H, s, H-8), 1.48 (3H, s, H-9), 1.64 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$: δ 134.3 (C-1), 120.7 (C-2), 26.7 (C-3), 41.4 (C-4), 24.3 (C-5), 30.8 (C-6), 58.2 (C-7), 24.2 (C-8), 24.6 (C-9), 23.5 (C-10) and 180.7 (C-3') (C=S).

N(4)-[2,2-Dimethyl-3-methylnorbornane]-thiosemicarbazide (**TIO C**): White crystals; yield 85%; mp. 106–109 °C; $[\alpha]_D^{+105}$; IR (KBr): (NH) 3261, (C=S) 1532; EI-MS m/z 227 (M^+); $^1\text{H-NMR}$: δ 5.36 (1H, brs, H-2), 1.83–1.98 (2H, m, H-3), 2.56 (1H, m, H-4), 1.75–1.79 (2H, m, H-5), 1.92–2.05 (2H, m, H-6), 1.50 (3H, s, H-8), 1.48 (3H, s, H-9), 1.64 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$: δ 134.3 (C-1), 120.7 (C-2), 26.7 (C-3), 41.4 (C-4), 24.3 (C-5), 30.8 (C-6), 58.2 (C-7), 24.2 (C-8), 24.6 (C-9), 23.5 (C-10) and 180.7 (C-3') (C=S).

Strain and culture conditions

The *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 strain used in this study was obtained from the Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), and was subcultured in tubes containing sloping Dextrose Sabouraud Agar medium (Difco & BBL Co., Le Pont de Claix, France), for 14 days, at 28 °C. Sterile 0.85% saline was added to the tubes, agitated, and filtered, and the conidial solution was standardised at 10^4 cells mL^{-1} , with a haemocytometer.

Fungal Inhibitory activity

Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by at least three experiments performed in duplicate, using the broth micro-dilution procedure, according to the recommendations of the

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002) [34]. The test compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and further dilutions were prepared in 0.85% sterile saline. In RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich Chemical Co., Missouri, USA, 8.6 g L⁻¹), after 72 h incubation, at 28 °C, the minimum inhibitory concentration (the lowest concentration of the compound that inhibited visible growth of fungus) was determined.

Fungicidal activity

The minimal fungicidal concentrations (MFCs) of the compounds were obtained by a subculture of 10 µL from minimum-inhibitory-concentration wells, without visible growth, placed in Petri dishes containing Dextrose Sabouraud Agar medium. After incubation for 72 h at 28 °C, the minimum fungicidal concentration was determined by the lowest concentration without fungus growth.

Scanning electron microscopy (SEM)

Cells were incubated in RPMI 1640 medium for 72 h at 28 °C with **TIO C** compound, in four tubes, at 55 µmol L⁻¹, 110 µmol L⁻¹, 220 µmol L⁻¹, and a negative control. The tubes were centrifuged, and the pellets washed twice with PBS (pH 7.2). The pellets were fixed with 2.5% glutaraldehyde and placed on cover slips (3 x 3 mm²) treated with poly-L-lysine. The cover slips were washed three times in 0.1 mol L⁻¹ sodium cacodylate buffer and dehydrated in a graded ethanol series, critical-point dried, sputter-coated with gold, and assessed by means of a scanning electron microscope (Shimadzu SS 550).

Nail fragments invasion test

The procedure described by Rashid *et al.* [35] was performed, with modifications. Healthy volunteers provided broken-off nails for this procedure. The nails were cut in pieces of about 3 x 3 mm² and sterilised in an autoclave at 121 °C for 15 min. The sterilised nail fragments were pre-exposed to a suspension containing 10⁵ spores/mL of *T. mentagrophytes* for 1 h, at 28 °C. The nail fragments were then removed from the spore suspension and placed in a 24-well plate containing 500 µL of ion solution. **TIO C** solution was added to the wells at concentrations of 55 µmol L⁻¹, 110 µmol L⁻¹, and 220 µmol L⁻¹. The plate was incubated for 72 h at 28 °C. The nail fragments were fixed with 2.5% glutaraldehyde dehydrated in a graded ethanol series, critical-point dried, sputter-coated with gold, and examined by means of a scanning electron microscope (Shimadzu SS 550).

Fungus cell wall integrity analysis

Calcofluor White stains the cell wall of fungi, binding to chitin chains. Calcofluor White (Sigma Biochemical, St. Louis, MO, USA) was utilised to stain the cell walls of *T. mentagrophytes*, in order to show the effect of **TIO C** by means of the fluorescence of the stain. Solutions with MIC and sub-MIC of **TIO C** were placed in 24-well plates containing coverslips and 500 µL of RPMI medium. A suspension with inoculum of 2,000–3,000 spores was added to each well, and incubated at 28 °C for

48 h. Spores not treated with **TIO C** or treated with the solvent DMSO were included as controls. The medium was drained off the wells, and 250 μL of 0.1 mmol L^{-1} Calcofluor White solution was added to stain the cell walls. After 15 min of incubation at room temperature, the coverslips were rinsed with 0.1 mol L^{-1} phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The coverslips were observed in a fluorescence microscope (Zeiss Axiocam – Axioshop 2 plus).

Ergosterol effect assay

The MIC of **TIO C** against *T. mentagrophytes* was determined as described previously [31], in the presence and in the absence of ergosterol (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA), at the concentrations 60, 125, 250, and 500 $\mu\text{mol mL}^{-1}$, added to RPMI 1640 medium. Amphotericin B (Cristalia Ltda, São Paulo, Brazil) was used as the control drug. At least three experiments were performed in duplicate.

Conclusions

The thiosemicarbazide derived from camphene (**TIO C**) shows a greater antifungal effect when compared with thiosemicarbazide without a substituent group (**TIO**). The incorporation of camphene into the thiosemicarbazide molecule is responsible for the increase in antifungal activity. **TIO C** apparently acts on the fungus cell wall, as substantiated by calcofluor assay and SEM images showing distorted and swollen hyphae, suggesting a weakening of the cell wall. However, further investigations are necessary to elucidate the mode of action of **TIO C**, seeking to make use of this derivative in combating fungal diseases, especially those caused by the fungus *T. mentagrophytes*, which are difficult to treat and are increasing in prevalence worldwide.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Araucária, FINEP, CNPq, and CAPES.

References and Notes

1. Campbell, A.W.; Anyanwu, E.C.; Morad, M. Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis. *Sci. World J.* **2004**, *4*, 760-777.
2. Havlickova, B.; Viktor, A.C.; Friedrich, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* **2008**, *51*, 2-12.
3. Loo, D.S. Onychomycosis in the elderly: drug treatment options. *Drugs Aging* **2007**, *24*, 293-302.
4. Weitzman, I.; Summerbell, R.C. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Res.* **1995**, *8*, 240-259.
5. Ghannoum, M.A.; Hajjeh, R.A.; Scher, R.; Konnikov, N.; Gupta, A.K.; Summerbell, R.; Sullivan, S.; Daniel, R.; Krusinski, P.; Fleckman, P.; Rich, P.; Odom, R.; Aly, R.; Pariser, D.; Zaiac, M.; Rebell, G.; Leshner, J.; Gerlach, B.; Ponde-de-Leon, G.F.; Ghannoum, A. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, *43*, 641-648.

6. Iorizzo, M.; Piraccini, B.M.; Tosti, A. New fungal nail infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2007**, *20*, 142-145.
7. Borman, A.M.; Campbell, C.K.; Fraser, M.; Johnson, E.M. Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Med. Mycol.* **2007**, *45*, 131-141.
8. Borges, M.; Degreef, H.; Cauwemberg, G. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. *Curr. Drug Targets* **2005**, *6*, 849-862.
9. Hainer, B.L. Dermatophyte Infections. *Am. Fam. Physician* **2003**, *76*, 101-108.
10. Seebacher, C. Action mechanisms of modern antifungal agents and resulting problems in the management of onychomycosis. *Mycoses* **2003**, *46*, 506-510.
11. Mock, M.M.; Baudraz-Rosselet, F.; Panizzon, R.G. Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested in vitro and in vivo. *Dermatology* **1998**, *197*, 361-367.
12. Pintilie, O.; Profire, L.; Sunel, V.R.; Popa, M.; Pui, A. Synthesis and antimicrobial activity of some new 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole compounds having a D,L-methionine moiety. *Molecules* **2007**, *12*, 103-113.
13. Bhat, A.R.; Athar, F.; Van Zyl, R.L.; Chen, C.T.; Azam, A. Synthesis and biological evaluation of novel 4-substituted 1-([4-(10,15,20-triphenylporphyrin-5-yl)phenyl]methylidene) Thiosemicarbazides as new class of potential antiprotozoal agents. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 764-776.
14. Leite, A.C.; Lima, R.S.; Moreira, D.R.; Cardoso, M.V.; Gouveia de Brito, A.C.; Farias dos Santos, L.M.; Hernandez, M.Z.; Kiperstok, A.C.; Lima, R.S.; Soares, M.B. Synthesis, docking, and in vivo activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3749-3757.
15. Rameshkumar, N.; Veena, A.; Lavarasan, R.; Adiraj, M.; Shanmugapandiyar, P.; Sridhara, S.K. Synthesis and biological activities of 2,6-Diaryl-3-methyl-4-piperidone derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 188-193.
16. Agarwal, R.K.; Singh, L.; Sharma, D.K. Synthesis, spectral, and biological properties of Copper(II) complexes of thiosemicarbazones of Schiff bases derived from 4-aminoantipyrine and aromatic aldehydes. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2006**, *2006*, 1-10.
17. Demirbas, N.; Karaoglu, S.A.; Demirbas, A.; Sancak, K. Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole and 1-(4-phenyl-5-thioxo-[1,2,4]triazol-3-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4] triazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 793-804.
18. Dogan, N.H.; Rollas, S.; Erdeniz, H. Synthesis, structure elucidation and antimicrobial activity of some 3-hydroxy-2-naphthoic acid hydrazide derivatives. *Il Farmaco* **1998**, *30*, 462-467.
19. Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. Antifungal agents: mechanism of action. *Trends Microbiol.* **2003**, *11*, 272-279.
20. Pandeya, S.N.; Sriram, D.; Nath, G.; DeClercq, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derivatives from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, *9*, 25-31.
21. Li, X.Y.; Wang, S.H.; Li, Z.M.; Su, N.; Zhao, W.Z. Synthesis of novel 2-phenylsulfonyl-hydrazono-3-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-beta-d-glucopyranosyl) thiazolidine-4-ones from thiosemicarbazide precursors. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2867-2870.

22. Salgin-Göksen, U.; Gökhan-Kelekçi, N.; Göktaş, O.; Köysal, Y.; Kiliç, E.; Işık, S.; Aktay, G.; Ozalp, M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5738-5751.
23. Wang, P.; Kong, C.H.; Zhang, C.X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L. *Molecules* **2006**, *11*, 549-555.
24. Letchamo, W.; Ward, W.; Heard, B.; Heard, D. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3915-3919.
25. Magwa, M.L.; Gundidza, M.; Gwerua, N.; Humphrey, G. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *103*, 85-89.
26. Sharma, N.; Tripathi, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 337-344.
27. Maccioni, E.; Cardia, M.C.; Bonsignore, L.; Plumitallo, A.; Pellerano, M.L.; De Logu, A. Synthesis and anti-microbial activity of isothiosemicarbazones and cyclic analogues. *Il Farmaco* **2002**, *57*, 809-817.
28. Maccioni, E.; Cardia, M.C.; Distinto, S.; Bonsignore, L.; De Logu, A. An investigation of biological effect of structural modifications investigation of isothiosemicarbazones and their cyclic analogues. *Il Farmaco* **2003**, *58*, 951-959.
29. Peng, C.; Dong, C.; Hou, Qiaomin, H.; Xu, C.; Zhao J. The hydrophobic surface of PaAMP from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal membrane lipid and the antifungal activity. *FEBS* **2005**, *579*, 2445-2450.
30. Warnock, D.W. Amphotericin B: an introduction. *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *28*, 27-38.
31. Sortino, M.; Delgado, P.; Juarez, S.; Quiroga, J.; Aboni, R.; Insuasty, B.; Noguerras, M.; Roderio, L.; Garibotto, F.M.; Enriz, R.D.; Zacchino, A.A. Synthesis and antifungal activity of (Z)-5-arylidenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 484-494.
32. Adams, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **2004**, *150*, 2029-2035.
33. Silva, C.C.; Almagro, V.; Marsaioli, A.J. A direct route to terpene isothiocyanates. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *34*, 6717-6720.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M38-A*. NCCLS: Wayne, PA, USA, 2002.
35. Rashid, A.; Scott, E.M.; Richardson, M.D. Inhibitory effect of terbinafine on the invasion of nails by *T. mentagrophytes*. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1995**, *33*, 718-723.

Sample Availability: The samples are available from the authors.

CAPÍTULO III

Conclusões

A planta *Ocotea odorifera* possui atividade antifúngica que justifica a sua utilização na medicina tradicional no tratamento das dermatoses:

- A fração metanólica F5 obtido de folhas da planta *O. odorifera* apresentou atividade antifúngica com a CIM de 12,5 µg/mL, contra cepa de *C. parapsilosis*.
- A substância pura isolada a partir da fração F5 e identificada como telimagrandin II por técnicas espectrais, apresentou maior atividade antifúngica contra *C. parapsilosis* com CIM de 1,5 µg/mL.
- O telimagrandin II apresentou atividade sinérgica em combinação com os antifúngicos nistatina, anfotericina e fluconazol.
- O teste de citotoxicidade *in vitro* realizado com a fração F5 apresentou maior índice de seletividade pela célula fúngica que pelas células dos mamíferos.
- A fração F5 testada *in vivo* não apresentou atividade genotóxica.
- Pela microscopia eletrônica de varredura foram observadas alterações morfológicas em células leveduriformes tratadas com TEL.

Os derivados semi-sintéticos obtidos pela combinação da molécula tiossemicabazida de origem sintética, com os compostos naturais canfeno e limoneno, resultaram em aumento da atividade antifúngica:

- Os derivados semi-sintéticos TIO C e TIO L apresentaram maior atividade antifúngica contra fungos dermatófitos *T. mentagrophytes*, com CIM de 55 $\mu\text{mol/L}$ e 110 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.
- Os derivados TIO C e TIO L apresentam moléculas com maiores características hidrofóbicas.
- Pela microscopia eletrônica de varredura foi observada inibição do crescimento do *T. mentagrophytes* após tratamento com TIO C em concentração CIM.
- Alterações morfológicas foram observadas nas hifas de *T. mentagrophytes* cultivadas em fragmentos de unhas, após exposição dos esporos ao TIO C em concentração de 55 $\mu\text{mol/L}$ e 110 $\mu\text{mol/L}$.
- O composto TIO C não tem afinidade pelo ergosterol.
- O provável mecanismo de ação do composto TIO C parece estar relacionado com a parede celular do fungo, visto que após tratamento com TIO C e exposição ao calcofluor observou-se diminuição da fluorescência da parede celular na microscopia ótica.

A descoberta de novas moléculas bioativas para o desenvolvimento de fármacos com a eficiência desejada, pode ser obtida a partir do conhecimento

popular das propriedades das plantas medicinais, tal qual a *O. odorifera*, popularmente conhecida como “canela-sassafrás” e utilizada na medicina tradicional no tratamento de dermatoses. O sucesso no isolamento da molécula telimagrandina II está diretamente correlacionada ao conhecimento popular que direcionou a pesquisa científica para a descoberta do produto natural com eficaz atividade antifúngica, que explica a utilização da planta no tratamento das dermatoses.

Produtos sintéticos e produtos naturais com moderada atividade biológica podem tornar-se fonte de derivados semi-sintéticos com desejáveis atividades biológicas, como mostrado através da combinação das moléculas tiosemicarbazida, canfeno e limoneno, que originou o derivado semi-sintético TIO C com atividade antifúngica potencializada.

Os compostos telimagrandina II e TIO C podem no futuro servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A descoberta de novas moléculas bioativas por si só representa um passo importante no desenvolvimento de novas drogas. Porém, da molécula ativa à comercialização do medicamento, há um desafio científico que vem de encontro com as necessidades clínicas do ponto de vista social e de saúde pública, além da necessidade de apoio das entidades de fomento para a realização das pesquisas científicas básicas.

Visando a continuidade do trabalho até então realizado, existem perspectivas de estudos mais amplos da atividade das moléculas telimagrandina II e TIO C frente a outros micro-organismos como os protozoários, bactérias, vírus e outras espécies de fungos.

A elucidação completa do mecanismo de ação, assim como a complementação dos testes de toxicidade e genotoxicidade, estudos *in vivo* de um modelo de infecção experimental e estudos farmacodinâmicos se fazem necessários. Para a realização de tais pesquisas, projetos em colaboração com diferentes grupos de pesquisas podem ser desenvolvidos, visto que há grandes necessidades clínicas e um longo caminho a percorrer até obtenção de novas drogas que ofereçam eficácia e segurança.

ANEXO I

RESULTADOS COMPLEMENTARES

1. Estudos estruturais por MS/MS

A substância com atividade antifúngica obtida de folhas da *O. odorifera* foi caracterizada por ESI-MSMS no modo negativo, após dissolução da substância em MeOH/H₂O (3:1, v:v), por infusão direta. O equipamento utilizado foi um sistema quadrupolo tandem Waters Quattro[®] Premier XE, com fonte de electrospray (ESI).

No primeiro espectro obtido (Figura 1) a análise espectrométrica de massa no modo negativo permite observar o íon quasimolecular [M-H]⁻ m/z 937 que é referente à substância de massa 938 Da, que coincide com a massa do tanino hidrolisável telimagrandina II (Figura 2) pertencente ao subgrupo dos elagitaninos.

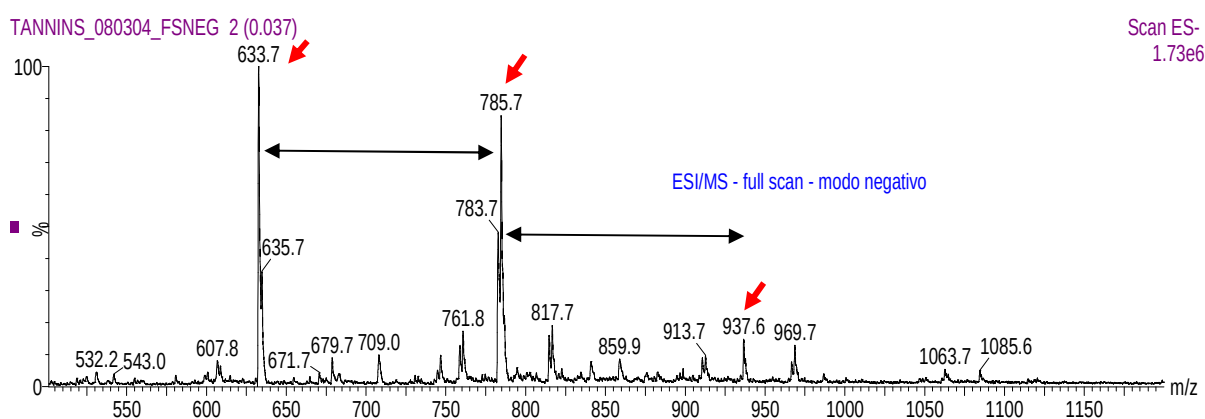


Figura 1. Espectro de massas no modo negativo da substância

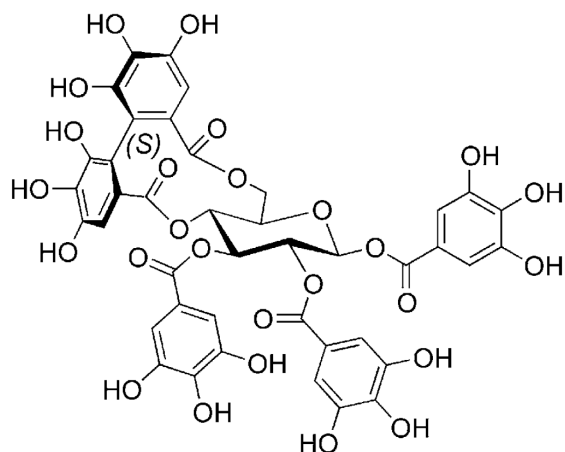


Figura 2. Estrutura química da telimagrandina II, m/z 938

Na Figura 1 é possível verificar no espectro a presença da série m/z 633, 785 e 937 que se diferenciam pelo número de resíduos de ácido gálico, que corresponde a 152 unidades de massas.

O estudo da fragmentação da série de íons m/z 633, 785 e 937 foi realizado em um experimento de íons fragmento demonstrado no espectro da Figura 3.

Na Figura 3 pode ser observada a presença de vários fragmentos em comum, que reforça a suposição de substâncias similares, com alteração somente no número de resíduos de ácido gálico.

Na Figura 4 as estruturas dos fragmentos gerados a partir do íon m/z 785 (ESI-), se mostram de acordo com a estrutura proposta da telimagrandina II com resíduos de ácido gálico a menos.

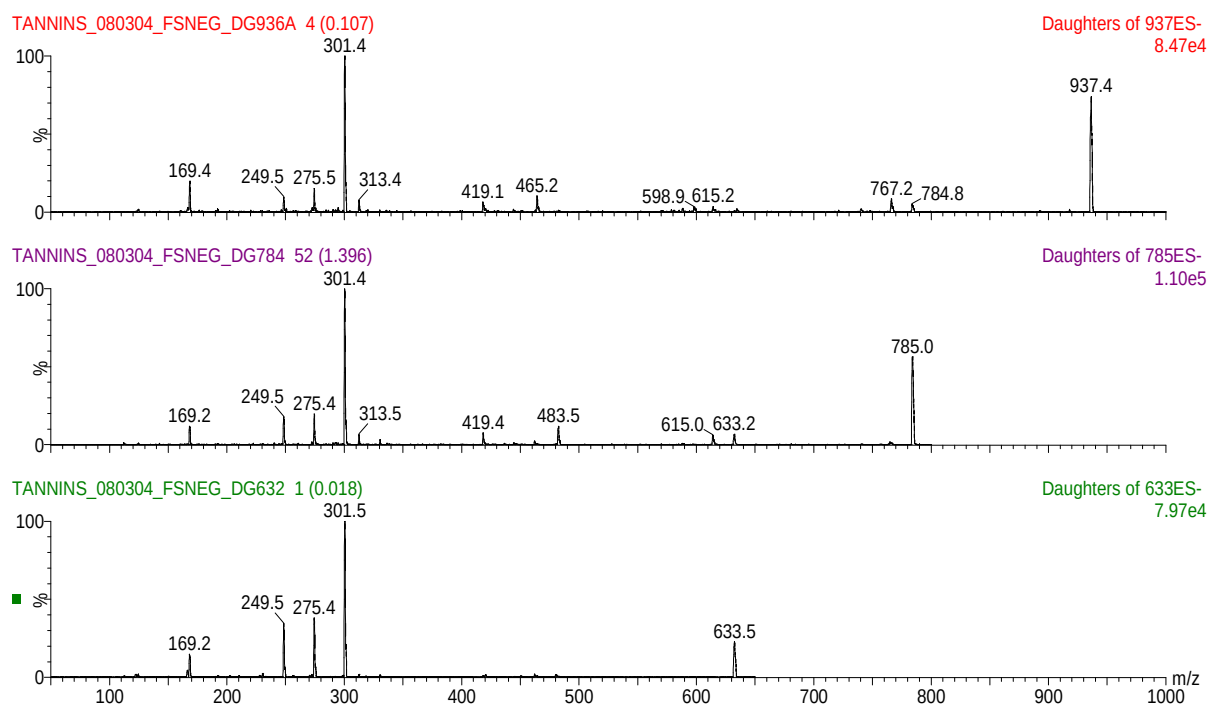


Figura 3. Espectros de MS/MS de íons fragmento dos íons de m/z 937, 785 e 633 (ESI-)

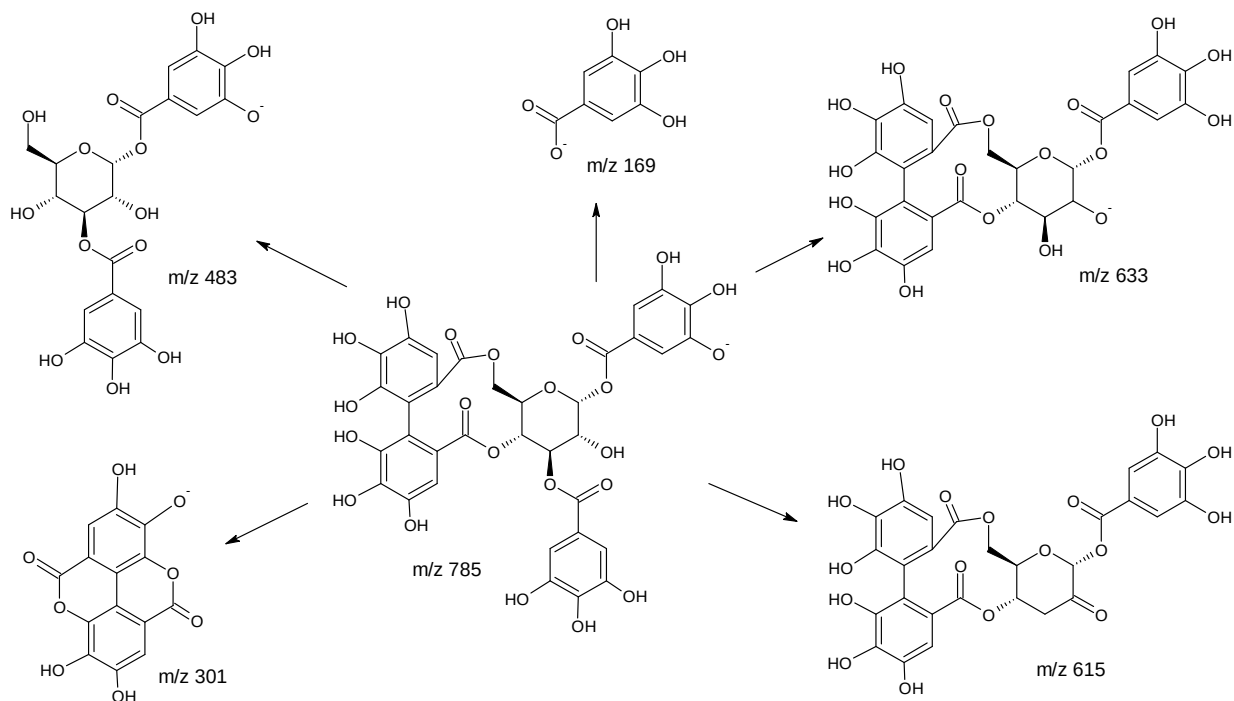


Figura 4. Estruturas químicas dos fragmentos gerados a partir do íon de m/z 785

Estudo dos íons precursores (íons pais) do íon m/z 301 no modo negativo pode ser analisado pelo espectro demonstrado a seguir (Figura 5).

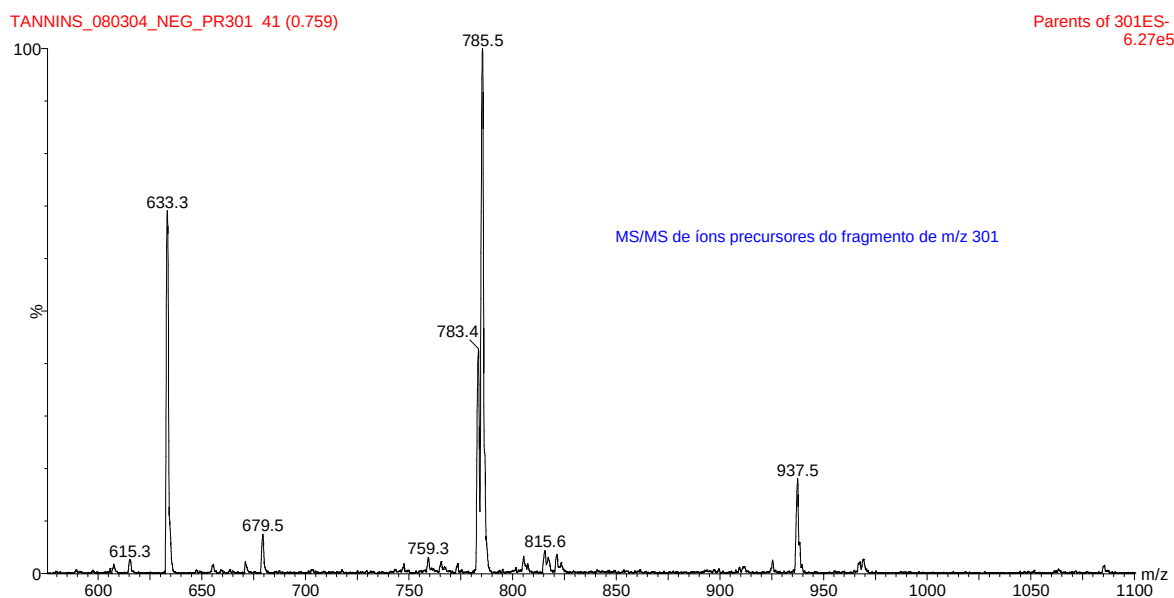


Figura 5. Espectro de MS/MS de íons precursores do íon m/z 301 (ESI-)

A substância telimagrandina II isolada das folhas da planta *O. odorifera* foi caracterizada por ESI-MSMS no modo negativo. A análise do espectro de massas revelou um ânion de massa molecular 937. Este íon ao eliminar um resíduo de ácido gálico, resulta em um fragmento de massa molecular 785, o qual subsequentemente fragmentado gera fragmento de massa molecular 301. O ânion de peso molecular 785 ao eliminar um segundo resíduo de ácido gálico, revela a presença do fragmento de peso molecular 633, previamente descrito na literatura por Salminen et al. (1999).

2. Alterações morfológicas e ultraestruturais de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com TEL e F5

As leveduras são fungos típicos que possuem a mesma estrutura subcelular que os animais superiores. A parede celular existente na célula fúngica, única estrutura que diferencia da célula animal, está situada na superfície externa da célula e possui um importante papel no transporte de materiais para dentro e fora da célula fúngica. Representa a primeira linha de defesa do fungo sendo também o primeiro alvo dos agentes quimioterápicos (Osumi, 1998).

Microscopias eletrônicas foram realizadas de cepas de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, após cultivo e tratamento com extrato metanólico F5 de folhas da planta *O. odorifera* e do composto isolado telimagrandina II.

As Figuras 1 e 2 mostram formas leveduriformes de *C. parapsilosis* cultivadas em caldo Sabouraud dextrose, durante 24 h, a 36 °C e tratadas com tellimagrandina 3,2 µM. As imagens foram processadas por microscopia eletrônica de transmissão, após as formas leveduriformes do controle e as leveduras tratadas serem lavadas em PBS, fixadas em glutaraldeído 25% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Após a fixação e lavagem com solução de cacodilato de sódio 0,1 M, foram pós-fixadas por 1 h com tetróxido de ósmio 1%, acrescentado de ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM. Após lavagem, as células foram desidratadas em acetona e incluídas em resina de Spurr®. Cortes ultrafinos

foram realizados por um ultramicrotomo Reichter Ultracut E, corados com acetato de uranila e observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss CEM-900.

As Figuras 1A e 1C mostram leveduras não tratadas, e apresentam parede celular íntegra e conteúdo citoplasmático preservado, enquanto em 1B observa-se regiões da parede celular mais espessa e outras partes delgadas. Em 1D e 1E a parede celular apresenta espessamento, com visível formação de parede celular secundária em 1F. A parede celular secundária é uma resposta à degradação da parede celular do fungo, onde algumas células desenvolvem uma estratégia não usual de formação da parede celular secundária abaixo da parede original. A parede secundária é mais grossa que a parede primária, entretanto esta não protege a célula da lise por apresentar-se composta de material amorfo (Farkas et al., 2009).

Brotamentos defeituosos, indicados com asteriscos, são também observados em 1D, 1E e 1F.

Através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 2) pode-se observar formas preservadas de *C. parapsilosis* em 2A (controle) e grandes alterações morfológicas após tratamento com telimagrandina II 3,2 μ M em 2B, e em 2C o asterisco indica grande massa extracelular de possível extravasamento de material citoplasmático, que deve ser decorrente de rupturas da parede celular, tal qual observado por microscopia eletrônica de transmissão em 2D. Material extracelular pode ser evidenciado em 2E, cuja célula apresenta-se praticamente sem conteúdo intracelular.

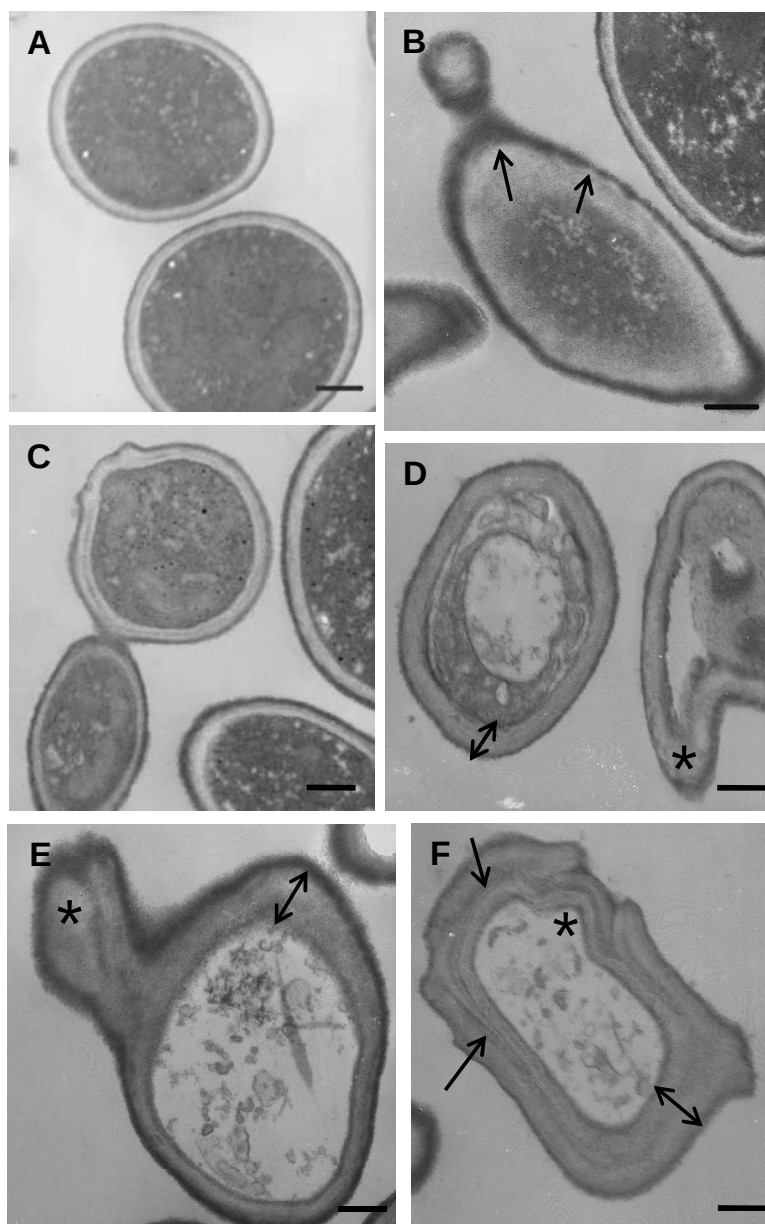


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão de *C. parapsilosis* cultivada em RPMI 1640, durante 24 h, 36 °C. (A,C) Controles. (B,D,E,F) Leveduras tratadas com tellimagrandina II 3,2 μ M. Alterações na ultraestrutura da célula fúngica: em (B) setas indicam alterações na parede celular com regiões espessas e regiões delgadas. (D), (E) e (F) Conteúdo celular alterado, setas duplas indicam espessamento da parede celular e os asteriscos indicam brotamentos defeituosos. Em (F) observa-se a formação de parede celular secundária (setas simples), que sugere uma estratégia da célula fúngica para tentar sobreviver em situações adversas. Barras = 1 μ m (Aumento 20.000X)

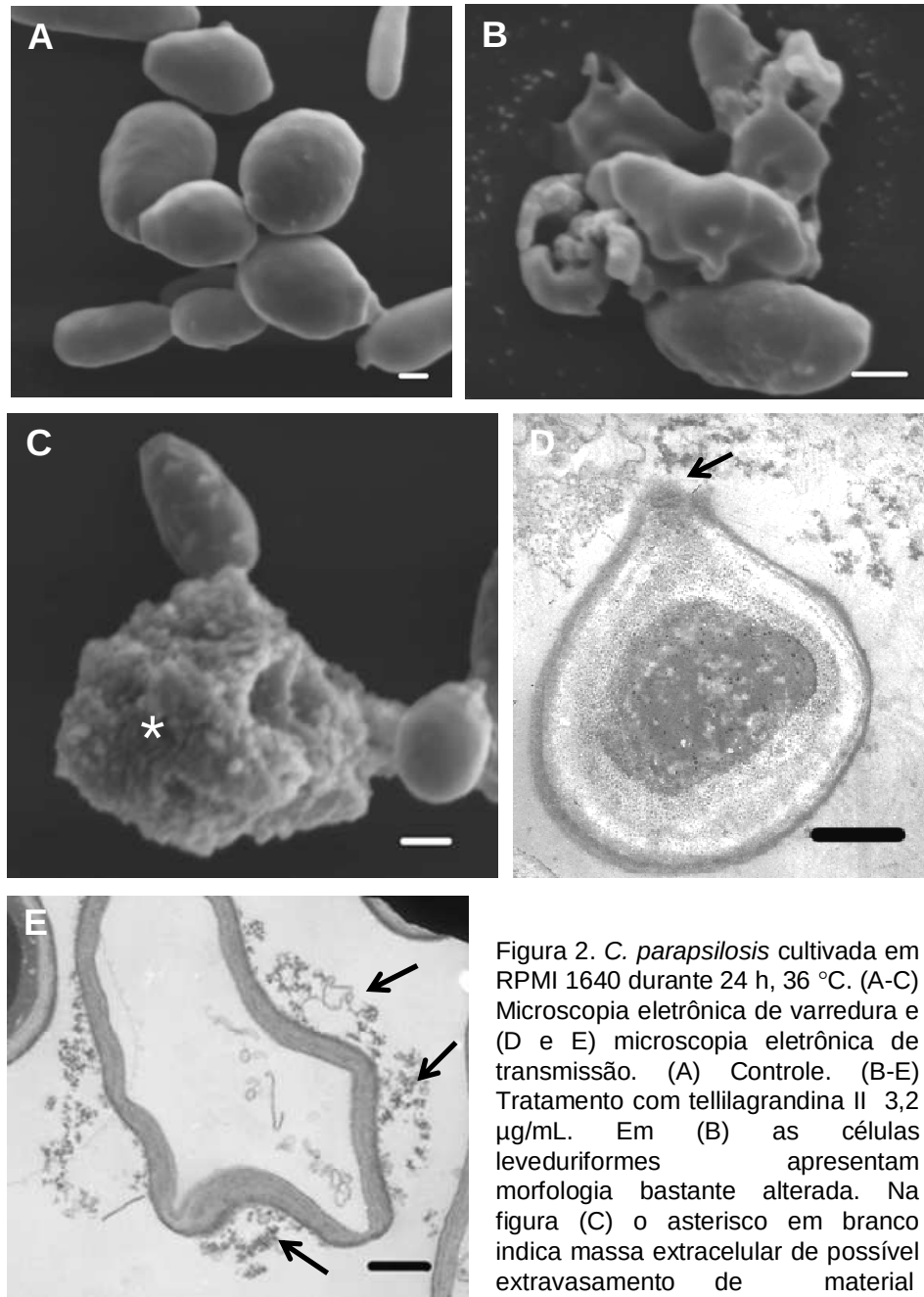


Figura 2. *C. parapsilosis* cultivada em RPMI 1640 durante 24 h, 36 °C. (A-C) Microscopia eletrônica de varredura e (D e E) microscopia eletrônica de transmissão. (A) Controle. (B-E) Tratamento com telluragrandina II 3,2 μg/mL. Em (B) as células leveduriformes apresentam morfologia bastante alterada. Na figura (C) o asterisco em branco indica massa extracelular de possível extravasamento de material citoplasmático da célula fúngica que pode ser embasado na microscopia eletrônica de transmissão em (D) que apresenta rupturas na parede celular e em (E) cuja célula está praticamente sem conteúdo intracelular com presença externa de material amorfo indicado pelas setas. Barra = 1 μm.

A microscopia eletrônica de varredura de *C. tropicalis* (Figura 3) tratadas com telimagrandina 3,2 μ M apresentou leveduras murchas e enrugadas (3C, 3D e 3E), com material intracelular sendo expelido para fora da célula fúngica em 3F e 3G. Enquanto as *C. albicans* tratadas (Figura 4) com a fração metanólica F5 da planta *O. odorifera* em concentração de 25 μ g/mL apresentaram a formação de grosseiras vesículas na superfície da célula (4C-F) e material intracelular sendo expelido para fora da célula em 4C e 4D.

As diferentes espécies de *Candida* apresentaram diferentes alterações morfológicas frente ao tratamento com composto e a fração metanólica obtidos a partir da planta *O. odorifera*, que pode justificar as diferenças frente às CIMs, porém necessita futuros estudos para melhor compreensão destas atividades.

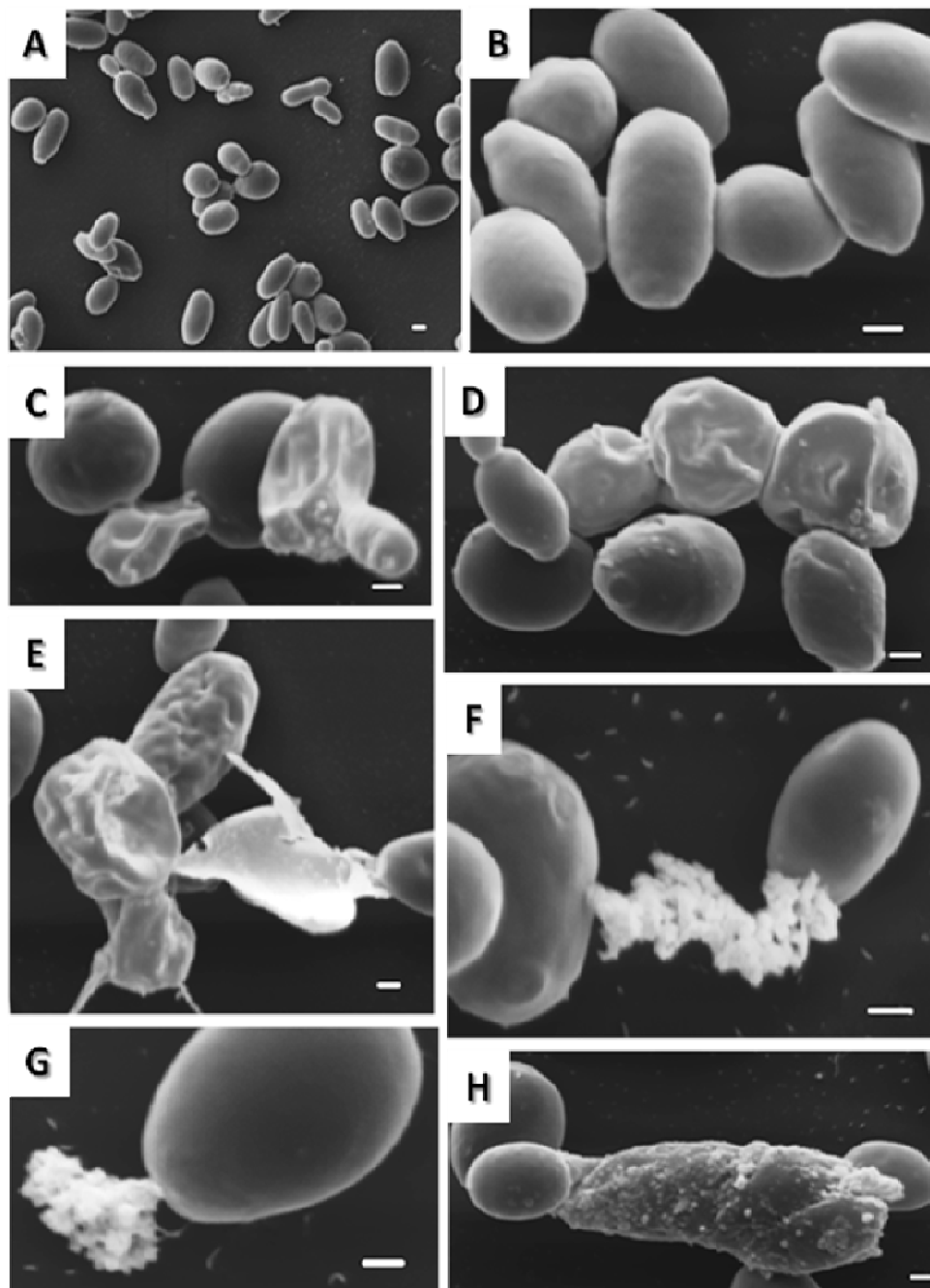


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de *C. tropicalis* ATCC 28707, cultivada em RPMI 1640, 48 h, 38 °C. (A) e (B) Controles. (C-H) Tratamento com telimagrandina 3,2 µM. Em (C), (D) e (E) observa-se alterações morfológicas das leveduras que se encontram murchas e enrugadas. (F) e (G) Material intracelular sendo expelido para fora da célula. (H) Estrutura retorcida e com vesículas na superfície celular. Barras = 1 µm.

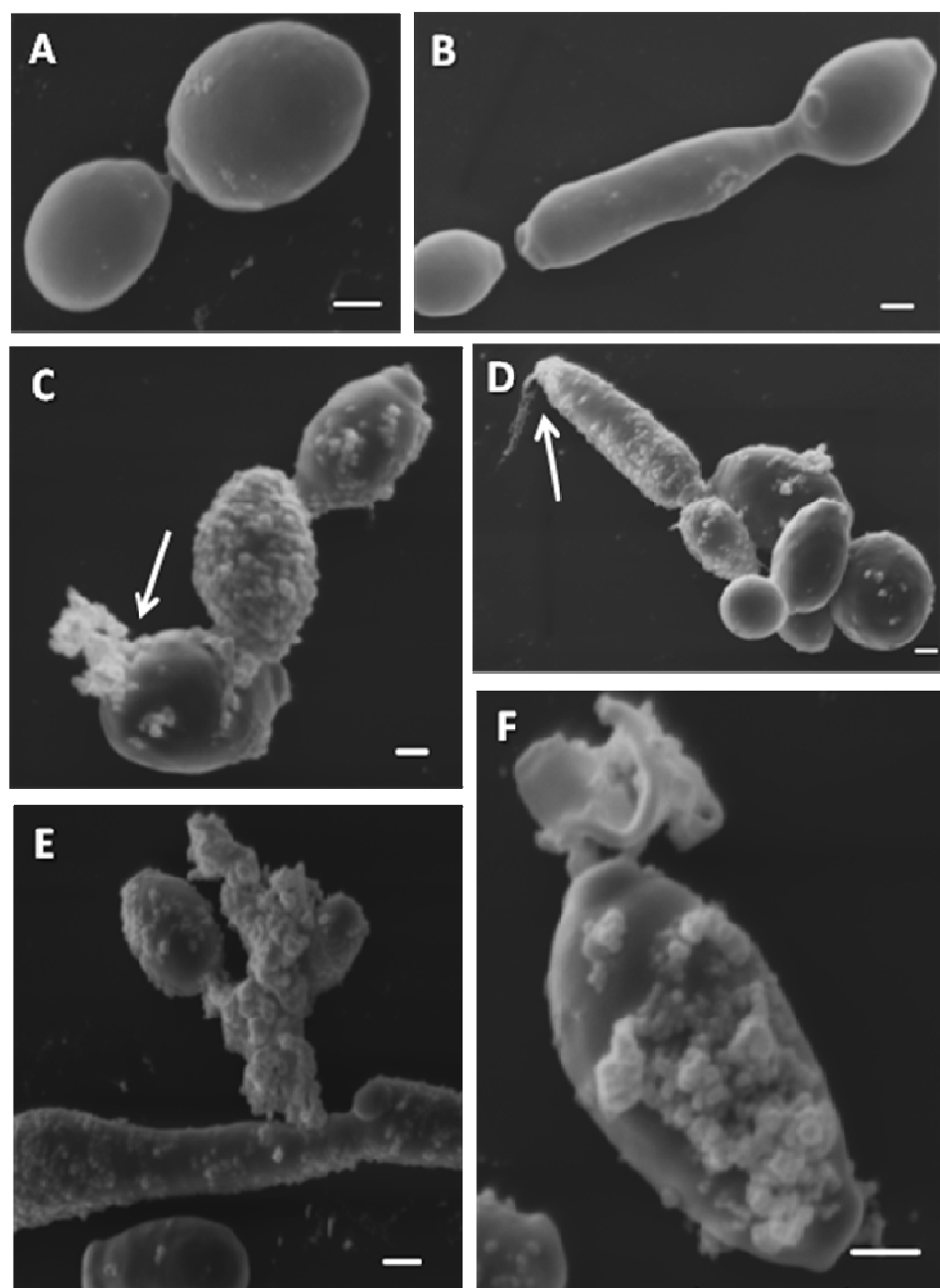


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* ATCC 10231 tratadas com a fração metanólica F5 25 $\mu\text{g/ml}$ em RPMI 1640 durante 24 h, 38 °C. (A) e (B) Controle. Alterações morfológicas grosseiras com presença de vesículas na superfície da célula fúngica são observadas em (C), (D), (E) e (F). Setas indicam material intracelular sendo expelido para fora da célula fúngica em (C) e (D). Barras = 1 μm .

3. Estrutura Otimizada do TIO C e TIO L

As três tiosemicarbazidas avaliadas possuem como diferença estrutural o substituinte em N-4, sendo para o TIO o hidrogênio, para o TIO L o limonemo e para o TIO C o canfeno. O limonemo e o canfeno pertencem à mesma classe dos monoterpenos, são compostos altamente hidrofóbicos e a sua incorporação no núcleo tiosemicarbazida tende a mudar este parâmetro.

Os resultados obtidos na atividade antifúngica destes compostos demonstram que a tiosemicarbazida não substituída (TIO) não apresenta atividade sobre o fungo, enquanto o TIO L e o TIO C são ativos. Isto pode ser atribuído ao maior caráter hidrofóbico do TIO L e do TIO C, onde um aumento da lipofilicidade do composto permite que a droga ultrapasse a membrana liposa do fungo, se tornando mais ativa (Maccione et al., 2002; Maccione et al., 2003).

A resposta biológica produzida por compostos bioativos está diretamente relacionada com os mecanismos de absorção, distribuição e atividade intrínseca. Os processos de absorção e distribuição destes compostos são regulados basicamente pela sua hidrofobicidade, uma vez que é necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas que formam os tecidos e sistemas multi-compartimentados dos seres vivos, até que alcancem seus respectivos sítios de ação (Peng et al., 2005).

A diferença nos valores de CIM e CFM para os derivados TIO L e TIO C provavelmente está associado à topologia da unidade terpênica e a fatores estéricos, cujas geometrias dos compostos foram otimizadas pelo método semi-empírico PM3 utilizando o software Gaussian 03W (Frisch et al, 2003) e podem ser observadas na Figura 5.

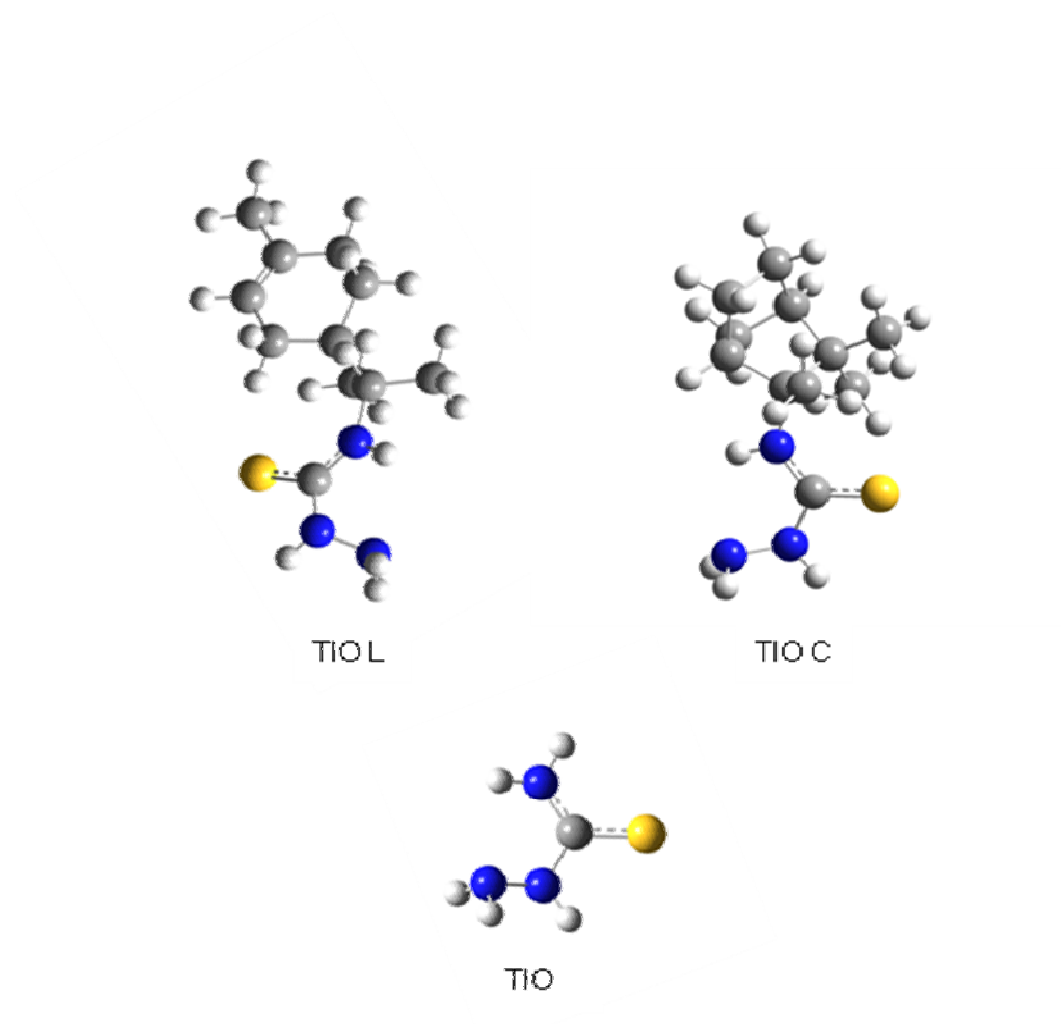


Figura 5. Estruturas otimizadas das tiossemicarbazidas TIO, TIO L e TIO C

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)