



UAlg **FCT**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Adição conjugada na alquilação de azoles e avaliação da sua atividade antifúngica em leveduras

Catarina Alexandra Silva do Carmo

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Américo Lemos

Professora Doutora Célia Quintas

2023



UAlg **FCT**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Adição conjugada na alquilação de azoles e avaliação da sua atividade antifúngica em leveduras

Catarina Alexandra Silva do Carmo

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Américo Lemos

Professora Doutora Célia Quintas

2023

Adição conjugada na alquilação de azoles e avaliação da sua atividade antifúngica em leveduras

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 17 de dezembro de 2023

© 2023 Catarina Alexandra Silva do Carmo

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Dedico este trabalho à minha mãe e avó, sem elas todo este percurso não teria sido possível, um obrigada não é suficiente para todo o apoio prestado ao longo destes 5 anos. As duas mulheres que me incentivaram a sair do meu cantinho na ilha e seguir um sonho, a ser a pessoa que sou hoje. Esta dissertação é para vocês.

Ao professor Américo Lemos, que mesmo sem se aperceber, influenciou o meu gosto pela química e celebrou cada conquista deste trabalho comigo, um enorme obrigada por todo o apoio ao longo da elaboração deste trabalho e pela disponibilidade prestada ao durante este ano.

À professora Célia Quintas, que ao longo deste trabalho se mostrou incansável respondendo a todas as questões, disponibilizando-se para me receber, um enorme obrigada!

À minha família que me apoiou ao longo do meu percurso académico, que me incentivou a estudar, que aceitou a normalidade de só me ver três vezes ao ano. Apesar de todos os obstáculos tornou-se possível a celebração desta conquista da vossa Catarina. Aos meus avós, Lúcia e Luís, obrigada por tudo o que me ensinaram, e onde quer que estejam, acredito que o orgulho será enorme. Aos meus irmãos, André e João, que nunca desistiram de mim e sempre estiveram à distância de uma chamada. Ao meu pai, por todas as palavras amigas que me disse ao longo destes anos, por acreditar na realização deste sonho. Ao Du, que me viu crescer e evoluir, que me apoiou quando decidi ir estudar para a UAlg, À Mena, que apareceu na minha vida e me ensinou tanto. Não somos nada sem a nossa família, a todos um enorme obrigada!

Ao meu namorado por me secar todas as lágrimas, me incentivar e acima de tudo acreditar em mim e no meu potencial.

Aos meus amigos, Carlos, João, Alex, Patrícia e Joana, um obrigada por todas as noites de estudo no C8, por tornarem esta aventura mais especial, por todos os momentos passados ao longo do curso, vocês foram a minha família.

Por último, à Daniela e Mariana, as minhas amigas desde sempre, que apesar da distância, estiveram sempre presentes e me apoiaram.

Índice

Agradecimentos	4
Índice de tabelas	6
Índice de figuras	7
Índice de esquemas	8
Resumo	9
Abstract.....	10
Abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	12
1.2. Células fúngicas	15
1.3. Compostos antifúngicos.....	20
1.4. Resistência aos antifúngicos	22
1.5. Alquilação dos compostos azólicos	24
1.5.1. Adição conjugada de azoalcenos	24
1.5.2. Compostos heterocíclicos	26
1.6. Objetivo	28
2. Materiais e métodos	30
2.1. Síntese dos precursores de reação	30
2.1.1. Síntese das hidrazonas.....	30
2.1.2. Síntese dos compostos azólicos.....	33
2.2. Atividade antifúngica.....	38
2.2.1. Leveduras utilizadas	38
2.2.2. Meios de cultura e soluções de compostos.....	38
2.2.3. Aplicação do método Kirby-Bauer.....	39
3. Resultados e discussão	41
4. Conclusão e perspectivas futuras	43
Referências Bibliográficas.....	47

Índice de tabelas

Tabela 1: Alguns fatores de predisposição a infecções fúngicas e microrganismos associados [adaptado de (1)].....	12
Tabela 2: Classificação das micoses [adaptado de (1)].....	14
Tabela 3: Algumas características das leveduras utilizadas no presente trabalho	19
Tabela 4: Mecanismos de resistência aos fármacos e genes responsáveis	23
Tabela 5: Halos de inibição do crescimento das leveduras induzidas pelos compostos/controles. Os valores representam médias±desvios-padrão do diâmetro dos halos inibitórios (mm); (-): ausência de halo; fluconazole (Flu); anfotericina B (AnfB); Compostos em estudo [5 mg/ml (100 µg)].....	42

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática da parede celular de <i>C. albicans</i> [adaptado de (13,14)]	16
Figura 2: Representação esquemática da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> [adaptado de (19)]	17
Figura 3: Representação esquemática da parede celular de <i>C. neoformans</i> [adaptado de (14)]	18
Figura 4: Via metabólica da síntese do ergosterol e locais de inibição pelos diferentes antifúngicos [Adaptado de (41)].....	22
Figura 5: Estrutura e numeração de nitroso e azoalcenos conjugados	24
Figura 6: Derivados do imidazole	27
Figura 7: Derivados do 1,2,4-triazole.....	28
Figura 8: Estrutura dos compostos sintetizados	37
Figura 9: Representação esquemática de uma placa de Petri com os discos de papel	40

Índice de esquemas

Esquema 1: Formação de DD induzida por base	25
Esquema 2: Plano geral da síntese compostos azólicos	26
Esquema 3: Métodos de síntese do núcleo pirazole	28
Esquema 4: Reação geral para obtenção de hidrazonas.	30

Resumo

A necessidade de novos antifúngicos é inegável, pois as terapêuticas atuais para o tratamento de infecções fúngicas invasivas são limitadas e a maior parte dos antifúngicos no mercado não são completamente eficazes devido ao desenvolvimento de resistências, toxicidade e efeitos adversos nocivos. As infecções fúngicas invasivas têm aumentado nos últimos anos assim como os níveis de mortalidade que lhes estão associados.

Os azoles são os antifúngicos mais utilizados devido às suas características de segurança e biodisponibilidade, contudo a sua aplicação não se restringe apenas aos cuidados de saúde humana, sendo utilizados na agricultura, veterinária e como constituintes de tintas e proteção de madeiras para prevenir bolores. A sua utilização múltipla levou a um grande crescimento de resistências em diversos ambientes. Os compostos azólicos têm um papel fundamental em várias reações químicas e biológicas não só por serem intermediários na síntese de moléculas mais complexas, mas por terem atividade biológica conhecida, por exemplo anticancerígena ou antifúngica.

Neste trabalho sintetizaram-se 6 compostos azólicos, dos quais 4 completamente desconhecidos, através de adição conjugada 1,4 de pirazole, 1,2,4-triazole e indazole a 1,2-Diaza-1,3-dienos (DDs) electrofílicos, estes gerados “*in situ*” por desidrocloração de α -cloro- ou α,α' -dicloro-hidrazonas induzida por base. Estudou-se a atividade antifúngica dos compostos sintetizados em relação às seguintes espécies de leveduras: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, e *Schizosaccharomyces pombe*, utilizando o método da difusão em agar adaptado da técnica de Kirby-Bauer. Através desta metodologia, foi possível observar a influência de diferentes núcleos azólicos, da estrutura e substituintes da hidrazona no grupo alquilante na inibição do crescimento microbiano de várias espécies de leveduras.

A presença de um grupo aromático como substituinte na hidrazona final e do núcleo indazólico foi um dos fatores diferenciadores na inibição do crescimento das leveduras.

Palavras-chave: azole; atividade antifúngica; 1,2-diaza-1,3-dieno; leveduras

Abstract

The need for new antifungal drugs is undeniable because the current therapeutics for the treatment of invasive fungal infections are limited and most of the drugs in the market aren't entirely effective due to the development of resistance, toxicity and harmful side effects. The invasive fungal infections have increased in the last years as well as the mortality levels associated to them.

The azoles are the most used antifungals due to their characteristics of security and bioavailability, however their application is not restricted to human healthcare, being used in agriculture, veterinary and as constituents of wood paints to prevent mold. Its multiple use led to a large rise of resistance in several environments. Chemically the azoles have a fundamental role in several chemical and biological reactions not only for being intermediaries in the synthesis of more complex molecules, but also for their known biological activity, for example anticancer or antifungal.

In this work 6 compounds were synthesized, of which four were totally new, via 1,4 conjugate addition of pirazole, 1,2,4-triazole and indazole with electrophilic azoalkenes, also named 1,2-diaza-1,3-dienes (DDs), these generated “*in situ*” by dehydrochlorination of α -chloro- or α,α' -dichloro hydrazones induced by base. The antifungal activity of the synthesized compounds was studied regarding the following yeasts species: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Schizosaccharomyces pombe*, using the agar diffusion method adapted from the Kirby-Bauer technique. Through this methodology, it was possible to evaluate the influence of the azolic groups and the substituents in the inhibition of the microbial growth of several yeasts' species.

The presence of an aromatic group as a substituent at the final hydrazone and indazole as the azole nucleus are the differentiating factors in the inhibition of the yeast growth.

Kew-words: azole; antifungal-activity; 1,2-diaza-1,3-diene; yeast

Abreviaturas

IFs: Infecções fúngicas

DA: Dies-Alder

DCM: Diclorometano

DD: 1,2-diaza-1,3-dieno

SIDA: Síndrome da imunodeficiência adquirida

GM: Galactomanano

GXM: Glucuronoxilomanano

AnfB: Anfotericina B

Flu: Fluconazole

CYP: Citocromo

CYP 450: Maior família de enzimas responsáveis pela catálise da biotransformação oxidativa da maior parte dos fármacos.

CYP3A4: Citocromo mais abundante no corpo humano, metaboliza grande parte dos fármacos comercializados.

CYP2D6: Citocromo pertencente à família CYP450

1. Introdução

A microbiota humana consiste numa grande variedade de microrganismos que vivem no organismo humano, realizando funções metabólicas muito importantes tais como, a estimulação da imunidade inata e prevenindo a colonização por patógenos indesejáveis, entre outras. A composição da microbiota é influenciada por diversos fatores, como a higiene, a dieta, a ingestão de água e fármacos, principalmente antibióticos, uma vez que a destruição desta população microbiana pode contribuir para infecções por fungos oportunistas. A predisposição para infecções fúngicas está relacionada com numerosos fatores, alguns deles identificados na Tabela 1.

Tabela 1: Alguns fatores de predisposição a infecções fúngicas e microrganismos associados [adaptado de (1)]

Fator de predisposição	Principais patógenos oportunistas
Estados de neutropenia	<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp
Transplantados e administração de fármacos	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp
Terapêuticas citotóxicas	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Pneumocystis</i>
Ventilação assistida	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp
Utilização de antibióticos de largo espectro	<i>Candida</i> spp
SIDA e hepatite C	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Pneumocystis</i>

Os fungos são seres eucariotas, inseridos no reino Fungi e têm como fator diferenciador a presença de ergosterol (desempenha funções a nível estrutural, de permeabilidade e de fluidez) na membrana citoplasmática e uma parede celular rígida constituída por uma rede de glucanos, quitina e proteínas. Estruturalmente contêm um núcleo bem definido,

mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. A sua estrutura somática pode ser unicelular, filamentosa ou dimórfica. Podem ser saprófitas, comensais ou parasitas.

Algumas das funções que tornam este grupo relevante na vida humana e nos ecossistemas resultam da sua utilização no fabrico de produtos alimentares, na produção de medicamentos e na sua importante função na degradação de matéria orgânica. Apesar deste papel positivo, alguns fungos podem provocar infeções tanto em indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos podendo levar à morte. As infeções fúngicas são uma ameaça significativa, e muitas vezes esquecida, que nos últimos anos se tem demonstrado cada vez mais emergente. Em Portugal, 1,5 milhões de pessoas desenvolvem uma infeção fúngica por ano. Estima-se que a nível mundial cerca de 300 milhões de pessoas são afetadas por infeções fúngicas e 1,5 milhões resultam em morte. Cerca de 90% destas mortes é causada por espécies dos géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Mucor* e *Rhizopus*. Existem espécies emergentes com elevada patogenicidade devido à capacidade de disseminação entre vários países que têm vindo a causar grande preocupação por serem multirresistentes. *Candida auris* é um exemplo de uma espécie resistente a numerosos antifúngicos, constituindo um desafio clínico por ser capaz de sobreviver nas condições de desinfeção disponíveis nos setores de saúde (2–4).

As infeções fúngicas, micoses (Tabela 2), podem ser classificadas como superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistémicas e oportunistas. As infeções sistémicas ocorrem quando o fungo atravessa a corrente sanguínea e se dissemina pelos sistemas internos. (5,6).

Tabela 2: Classificação das micoses [adaptado de (1)]

Micoses	Características	Exemplos de fungos	Doenças
Micoses superficiais	A expansão do fungo é limitada à zona exterior da epiderme (pele, unhas e raízes dos pelos). Em geral, não são destrutivas. Têm relevância cosmética.	<i>Malassezia furfur</i>	Pitiríase versicolor Dermatite seborreica
Micoses cutâneas	Infeções da camada queratinizada da pele, pelos e unhas. Podem tornar-se sintomáticas, apresentando prurido, descamação, lesões arredondadas na pele, unhas espessadas e opacas.	Dermatófitos (<i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i> e <i>Microsporum</i>)	Dermatofitias (Dermatófitos)/ dermatomicoses (não dermatófitos) Onicomicoses
Micoses subcutâneas	Envolvem as camadas mais profundas da pele, córnea, músculos e tecido conjuntivo. O sistema imunológico do hospedeiro não reconhece o fungo levando a destruição tecidual, úlceras que não cicatrizam e frequentemente hiperplasia epiteliomatosa.	<i>Alternaria</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Fusarium</i> <i>Mucor</i>	Feohifomicose Micetomas eumicóticos Mucormicoses subcutâneas
Micoses sistêmicas	Também conhecidas como micoses endêmicas, causadas por fungos dimórficos, geralmente confinados numa região, contudo a facilidade de movimentação entre países facilita a proliferação destes fungos. Estas infeções podem afetar indivíduos saudáveis, sendo que primariamente localizam-se no pulmão disseminando-se para outros órgãos.	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Histoplasmose Blastomicose
Micoses oportunistas	Infeções associadas a fungos existentes no ambiente ou ser humano, com exceção de <i>C. neoformans</i> , uma vez que estes têm uma virulência associada. Praticamente qualquer fungo pode atuar como fungo oportunista.	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus</i>	Criptococose Candidíase Aspergilose broncopulmonar alérgica Aspergilomas Aspergilose invasiva

Os fármacos presentes no mercado possuem uma capacidade reduzida de sucesso devido a atrasos nos diagnósticos das infecções fúngicas sendo a identificação dos organismos realizada tardiamente, levando ao adiamento do tratamento específico e direcionado (7).

1.2. Células fúngicas

As células fúngicas têm características específicas e importantes que as sinalizam quando no corpo humano, nomeadamente, a presença de parede celular. Esta representa o maior organelo do fungo, determina a sua viabilidade, morfologia, patogenicidade e interações com o ambiente. A parede celular envolve mais de mil genes que codificam o metabolismo celular, sinalizando e desempenhando funções bio-sintéticas. Alguns dos componentes da parede celular não estão identificados em humanos, mamíferos e plantas, como os glucanos, galactomanano (GM), glucuronoxilomanano (GXM) e algumas proteínas da parede celular (8).

Na parede celular, existem múltiplas classes de proteínas que desempenham variadas funções, podem modificar as propriedades da parede celular, a adesão a superfícies, e principalmente atuam na proteção do fungo a elementos nocivos ou coadjuvam na proteção contra fagócitos. Devido a todas estas características, a parede celular dos fungos é um dos principais alvos para o desenvolvimento da terapêutica antifúngica (9).

As leveduras possuem uma parede celular específica, que varia entre os vários géneros, devido aos seus constituintes e à forma como estes estão organizados estruturalmente. Os glucanos e a quitina são responsáveis pela parte estrutural dando rigidez e forma à parede celular. Algumas espécies possuem uma cápsula localizada externamente em relação à parede celular.

As espécies de leveduras utilizadas no presente estudo foram *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, devido à sua relevância clínica e *Saccharomyces cerevisiae*, por ser uma das espécies mais estudadas e também estarem descritos casos de infecções por esta

espécie. Seleccionaram-se também 2 espécies associadas a degradação alimentar, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Schizosaccharomyces pombe* por ser uma espécie cuja reprodução assexuada ocorre por fissão e não por gemulação.

Candida albicans

Um dos fungos oportunistas mais abundantes no corpo humano é *C. albicans*, que vive de forma comensal no organismo de indivíduos saudáveis. As alterações do sistema imunitário permitem que ocorram infecções fúngicas graves como as candidemias. As candidemias podem implicar risco de vida em indivíduos imunocomprometidos, aumentando a morbidade em portadores de doenças como diabetes e cancro.

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura dinâmica e modulada que gera formas elíticas e tubulares que definem a morfologia na qual o fungo consegue crescer. É constituída por manoproteínas, $\beta(1,6)$ -glucano, $\beta(1,3)$ -glucano e quitina, como representado na Figura 1 (10–13).

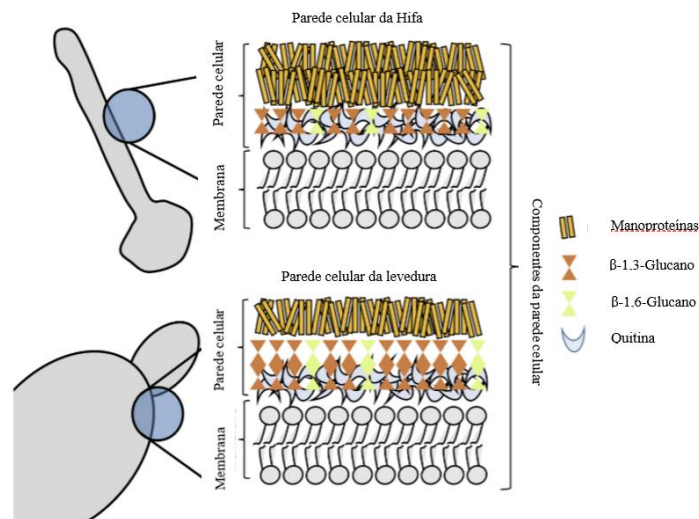


Figura 1: Representação esquemática da parede celular de *C. albicans* [adaptado de (13,14)]

Saccharomyces cerevisiae

É uma das leveduras mais conhecidas e é utilizada na fermentação de pão e bebidas alcoólicas. É um organismo unicelular, dos mais estudados a nível genético e fisiológico, o seu genoma serve como modelo para eucariotas.

Apesar de as infeções causadas por esta levedura em humanos serem escassas, podem acontecer, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Alguma literatura evidencia que *S. cerevisiae* está associada à doença de Crohn (15), uma vez que os portadores da doença possuem anticorpos contra este microrganismo. *S. cerevisiae* é também associada a doentes com asma, colite ulcerosa e diarreia.

A parede celular de *S. cerevisiae* é semelhante à de *C. albicans*, sendo constituída por manoproteínas, $\beta(1,6)$ -glucano, $\beta(1,3)$ -glucano e quitina (Figura 2) (15–18).

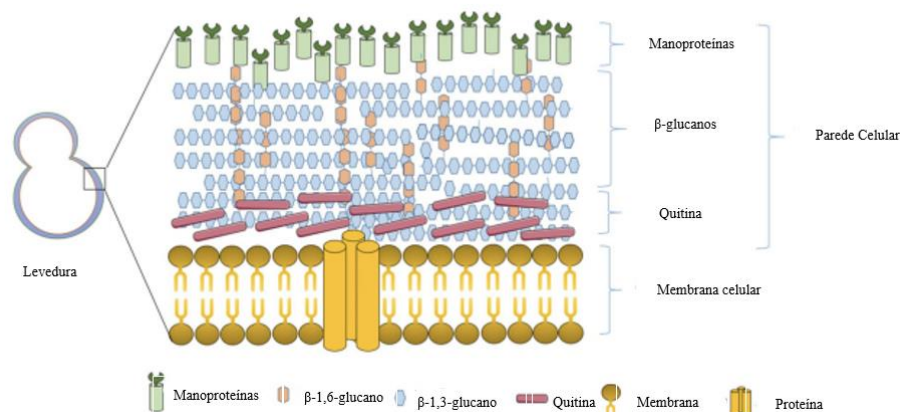


Figura 2: Representação esquemática da parede celular de *S. cerevisiae* [adaptado de (19)]

Cryptococcus neoformans

É um fungo oportunista patógeno que causa criptococose em indivíduos imunocomprometidos. A incidência desta doença tem vindo a aumentar e as terapêuticas

farmacológicas existentes demonstram não ser suficientemente efetivas para o seu tratamento (20).

Ao contrário das leveduras já descritas, *C. neoformans* possui uma cápsula composta por glucuronoxilomanano e galactoximanano. A capsula está ligada ao α (1,3)-glucano na parede celular subjacente. A parede celular é constituída por um núcleo β (1,3)-glucano- β (1,3)-glucano-quitina, e uma camada de melanina cuja localização exata não é conhecida, podendo estar incorporada nos polissacarídeos da parede celular (Figura 3) (21,22).

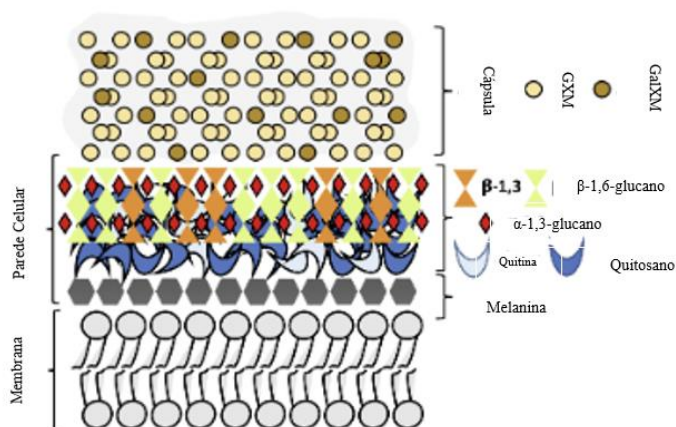


Figura 3: Representação esquemática da parede celular de *C. neoformans* [adaptado de (14)]

Leveduras de alteração alimentar

As leveduras são conhecidas pelo efeito positivo a nível da fermentação e produção de alimentos, contudo, algumas podem causar deterioração, sendo uma das maiores razões de alimentos “alterados/degradados”. As alterações causadas por estas leveduras podem ser físicas (cor, turvação) ou químicas (carbonatação, pH), o que resulta em perdas económicas avultadas. A procura por antifúngicos para aplicação na indústria alimentar e com atividade para este tipo de leveduras é essencial (23–25).

Resumem-se de seguida algumas das características das leveduras utilizadas no presente trabalho (Tabela 3) (26,27).

Tabela 3: Algumas características das leveduras utilizadas no presente trabalho

Levedura	Características
<i>C. albicans</i> (28,29)	<ul style="list-style-type: none">• Principal agente causador de candidíases e o causador primário de infecções fúngicas em adultos e crianças;• Levedura dimórfica: unicelulares e pseudohifas;• Constituinte da microbiota humana.
<i>S. cerevisiae</i> (16)	<ul style="list-style-type: none">• Responsável pelo processamento de bebidas alcoólicas devido à sua capacidade fermentativa e resistência ao etanol;• Alta capacidade fermentativa;• Tolerância aos ácidos orgânicos;• Algumas subespécies são utilizadas como probióticos no tratamento de diarreias e gastroenterites;• Presente no vinho, cerveja, azeitonas, etc...
<i>C. neoformans</i> (1,20,21)	<ul style="list-style-type: none">• Causador de infecções fúngicas (criptococoses), e frequentemente isolado na prática clínica;• Durante a infecção, <i>C. neoformans</i> modifica a parede celular e a cápsula. Este procedimento não está bem esclarecido;• Conhecido como o “fungo do pombo” por ser transmitido através das fezes desta ave;• Comensal no humano, levedura oportunista principalmente em indivíduos imunocomprometidos.
<i>H. uvarum</i> (30)	<ul style="list-style-type: none">• Presente na uva, tendo influência na produção de vinho;• Associada à degradação fermentativa de frutas, frescas ou processadas.
<i>Z. bailii</i> (31)	<ul style="list-style-type: none">• Altamente associado à degradação de alimentos e elevadas perdas económicas;• Elevada tolerância a altas concentrações de álcool, ácido acético e outros ácidos orgânicos fracos utilizados como conservantes;• Alta capacidade fermentativa;• Responsável pela degradação do vinho, bebidas carbonatadas, entre outros;
<i>S. pombe</i> (32)	<ul style="list-style-type: none">• “Levedura de fissão”, pela forma de reprodução por fissão;• Raramente é uma levedura de degradação.

1.3. Compostos antifúngicos

Os compostos antifúngicos podem ser divididos em cinco classes, (azoles, equinocandinas, polienos, alilaminas e antimetabolitos) com características específicas e formas de atuação diferentes (Figura 4) (9,33–37).

Os azoles são compostos cíclicos contendo um ou mais átomos de azoto. São maioritariamente fungistáticos e são formados por duas classes, os imidazoles (ex.: miconazole, cetoconazole) e triazoles (ex.: fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole). Inibem a C-14 α -desmetilase bloqueando a desmetilação do lanostenol em ergosterol. Esta inibição impossibilita o crescimento das células do fungo. Todos os azoles inibem a CYP3A4 (principal e mais importante isoenzima, do CYP450, presente no corpo humano, responsável pela metabolização de uma grande quantidade de fármacos) (38,39). O uso concomitante de inibidores (ritonavir) ou indutores (rifampicina) do CYP450 deve ser evitado, podendo levar a um aumento ou diminuição do efeito clínico. O seu principal efeito adverso é a teratogenicidade (9,40).

As equinocandinas são lipopeptídeos solúveis em água, são fungicidas, com atividade potente contra *Aspergillus* e *Candida* e estão disponíveis para administração intravenosa (IV) (ex. micafungina, caspofungina, anidulafungina). Atuam inibindo a síntese de β -(1,3)-D-glucano, por serem inibidores não competitivos da subunidade FKS1, interferindo com a síntese da parede do fungo, levando à lise e morte celular. A caspofungina é indutora da CYP450, podendo levar à necessidade de aumentar a dose e interage com a ciclosporina devido ao aumento da incidência das transaminases hepáticas. A micafungina e a anidulafungina não tem interações conhecidas. As equinocandinas podem causar febre, urticária, náuseas e flebite (9,40).

Os polienos são compostos orgânicos que contêm várias ligações carbono-carbono duplas e simples. Os polienos mais utilizados são a anfotericina B (AnfB) e a nistatina. A AnfB é fungicida ou fungistática dependendo do microrganismo e concentração utilizada. Os polienos ligam-se ao ergosterol da membrana formando poros e provocando interações entre o antifúngico polieno e o ergosterol do fungo. Os poros formados desorganizam a membrana

plasmática levando à saída de eletrólitos e entrada de pequenas moléculas, eventualmente tóxicas, resultando na morte celular. Os polienos podem ser medicamentos nefrotóxicos. Interagem com corticosteroides, potenciam hipocalcemia, e glicosídeos digitálicos. Podem causar febre, calafrios, lesão renal, hipotensão, tromboflebitas e anemia (9,40).

As alilaminas (ex.: terbinafina, naftifina, butenafina) são inibidores da enzima esqualeno epoxidase, bloqueando a biossíntese do ergosterol e são fungicidas. A acumulação de quantidades tóxicas de esqualeno leva ao aumento da permeabilidade da membrana e à eventual morte celular. Os mecanismos de ação destes compostos não estão totalmente esclarecidos. Como são inibidores da CYP2D6, deve ser evitado o uso concomitante com substratos dessa isoenzima. Podem causar distúrbios gastrointestinais, cefaleia, urticaria, distúrbios do paladar e visão e aumento das transaminases hepáticas (9,40).

O antimetabolito, flucitosina, é um análogo fluorado da pirimidina. É frequentemente utilizado com a AnfB para tratamento de micoses sistêmicas. É um composto fungistático ou fungicida dependendo do microrganismo. A flucitosina entra nas células do fungo através da permease citosina-específica, onde é convertida em compostos como o 5-Fluorouracilo que interrompe a síntese de ácidos nucleicos levando à morte celular. Não deve ser administrado concomitantemente com medicamentos nefrotóxicos, corticosteroides (potenciam hipocalcemia) e glicosídeos digitálicos. Podem causar febre, calafrios, lesão renal, hipotensão, tromboflebitas e anemia (9,40).

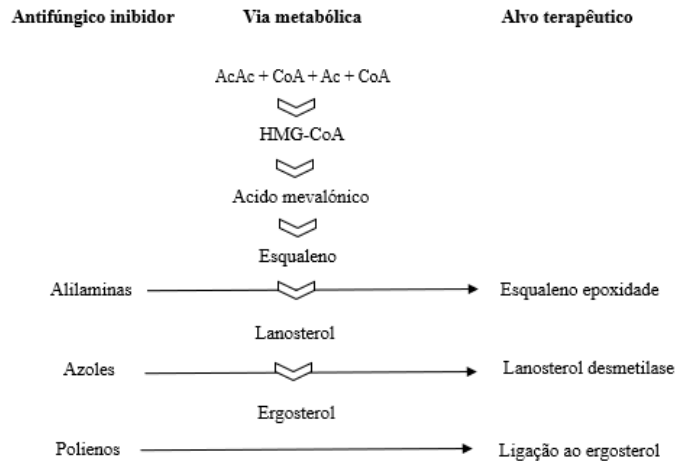


Figura 4: Via metabólica da síntese do ergosterol e locais de inibição pelos diferentes antifúngicos [Adaptado de (41)]

1.4. Resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos é um processo que demonstra a capacidade de sobrevivência e desenvolvimento de fungos na presença de um ambiente agressivo, o fármaco. Os mecanismos de resistência têm sido reportados, maioritariamente, a nível molecular, estes pretendem contrapor os efeitos fungistáticos e fungicidas dos fármacos (Tabela 4) (26,42–44).

Tabela 4: Mecanismos de resistência aos fármacos e genes responsáveis

Antifúngico	Mecanismo de resistência	Enzima/Gene	Caraterísticas
Azoles	Mutações no gene da C-14 α -desmetilase, diminuindo a ligação dos azóis. Alguns fungos possuem bombas de efluxo que bombeiam os azóis para o exterior da célula	Lanosterol desmetilase	14 α - Responsável pela conversão de lanosterol a ergosterol. Alvo da terapia azólica.
Equinocandinas	Mutação no gene FKS1 (β -(1,3)-D-glucano) Bomba de efluxo	FKS1 (β -(1,3)-D-glucano)	Enzima responsável pela síntese de glucano da parede celular do fungo
Polienos	Embora raro, está associado ao aumento do conteúdo de ergosterol na membrana fúngica ou por mutação no gene <i>Erg3</i> .	<i>Erg3</i>	Um dos genes responsáveis pela formação do ergosterol
Inibidores do esqualeno epoxidase	Mutação no gene <i>ErgA</i> que codifica a esqualeno epoxidase	<i>ErgA</i>	Gene que codifica a esqualeno epoxidase
Antimetabolitos	Diminuição das enzimas que convertem flucitosina em 5-Fluorouracila	Citocina permease e citosina deaminase	Enzimas conversoras da flucitosina

O controlo químico de fungos causadores de doenças em humanos e plantas é um processo que teve início com o uso de químicos inorgânicos até à atual sistemática de fungicidas.

A resistência aos azoles tem-se tornado um problema clínico muito significativo principalmente em doentes com tratamento prolongado.

No entanto, os compostos azólicos continuam a ser o tratamento dominante, devido às suas características de segurança, nomeadamente alta solubilidade, baixa toxicidade, ampla distribuição pelos tecidos e biodisponibilidade oral (26,45).

1.5. Alquilação dos compostos azólicos

Os nitrosoalcenos e azoalcenos conjugados (Figura 5) têm sido amplamente explorados por serem intermediários notáveis tanto na síntese de uma grande variedade de novos compostos heterocíclicos como na síntese total de moléculas naturais com atividade biológica. Estes sistemas são maioritariamente utilizados como heterodienos pobres em eletrões em reações de Dies-Alder com heterociclos ou olefinas ricas em eletrões e como aceitadores de Michael em reações conjugadas 1,4 com parceiros nucleofílicos.

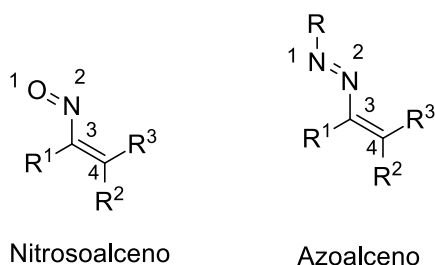


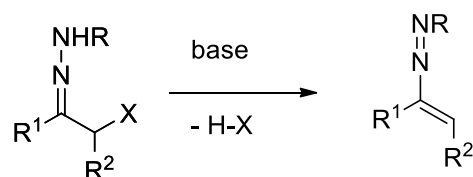
Figura 5: Estrutura e numeração de nitroso e azoalcenos conjugados

1.5.1. Adição conjugada de azoalcenos

Uma adição conjugada consiste essencialmente numa reação de adição de um nucleófilo a um sistema conjugado eletrofílico. O ataque do nucleófilo provoca disrupção do sistema π conjugado originando uma nova molécula. Os azoalcenos conjugados ou 1,2-diaza-1,3-dienos (DD), tem sido a base para preparação de uma imensa variedade de compostos quando utilizados como em adições conjugadas 1,4. Quando o substituinte presente no grupo diazo (em N1) é também retirador de electrões, reforça o alto poder eletrofílico do conjunto, e induz que o carbono terminal C-4 se torne altamente eletrofílico e suscetível ao ataque nucleófilo. As orbitais moleculares que controlam a reação serão a LUMO do DD e a HOMO

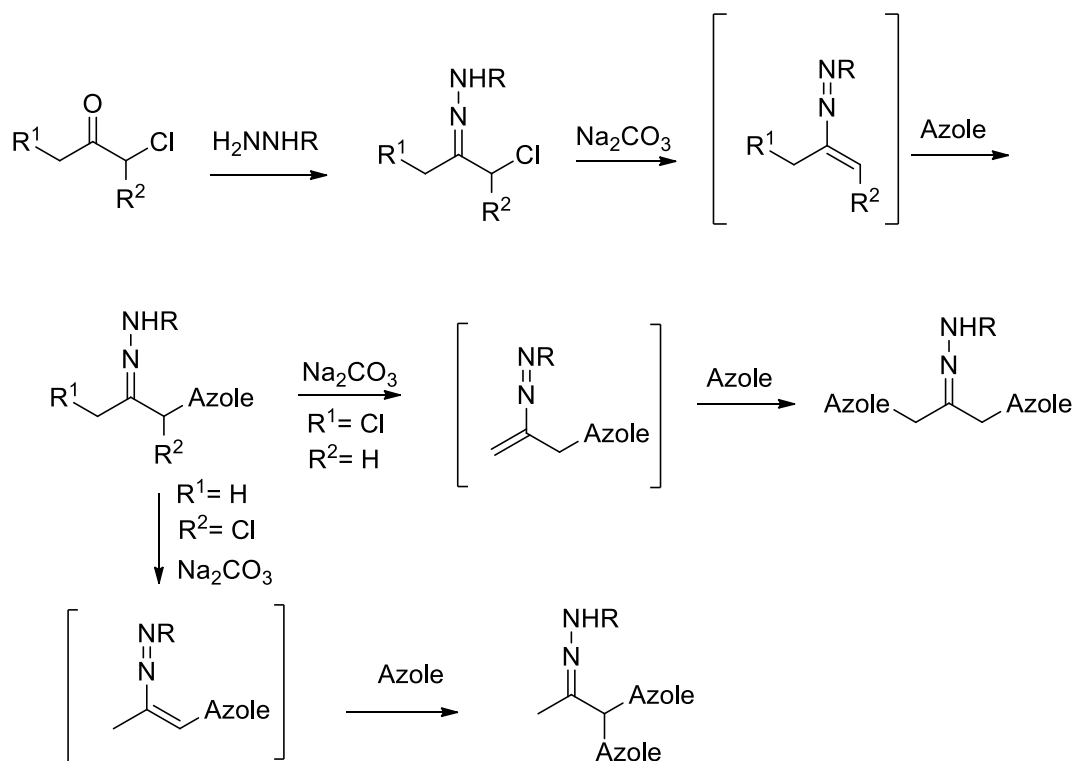
do nucleófilo atacante. Quanto maior a capacidade retiradora dos substituintes do DD, mais baixa será a energia da orbital LUMO correspondente. Quanto maior a capacidade doadora do dienófilo, mais elevada será energia da orbital HOMO, resultando então num diferencial energético mais baixo entre as duas orbitais, conduzindo assim a uma maior e melhor sobreposição e consequentemente a uma reação mais rápida e eficiente. Resumidamente, a eficiência desta reação estará diretamente associada à electrofiliidade dos DD (*LUMO controlled*) e à nucleofiliidade dos heterociclos ou nucleófilos utilizados (*HOMO controlled*) (46–51).

Os 1,2-diaza-1,3-dienos (DD), são azoalcenos conjugados, geralmente gerados “*in situ*” a partir das respectivas hidrazonas α -halogenadas, através de uma reação de eliminação de um grupo abandonante induzida por base (Esquema 1).



Esquema 1: Formação de DD induzida por base

As hidrazonas, precursoras dos DD, são normalmente preparadas a partir das respetivas cetonas ou aldeídos. A presença do grupo carbonilo da cetona, torna a molécula de fácil ataque, uma vez que os eletrões π são atraídos para o oxigénio gerando uma densidade eletrónica mais baixa em torno do carbono. A reação ocorre pela eliminação do grupo abandonante X, na posição α da hidrazona. O padrão de substituição nos carbonos C3 e C4 (R^1 e R^2 no Esquema 1), podem contribuir para a electrofiliidade geral do DD assim como para a sua estabilidade e tempo de vida. A presença de uma base inorgânica (Na_2CO_3), num solvente orgânico garante a lenta geração do sistema conjugado 4π (DD) e a sua baixa concentração em solução, garantindo assim uma maior probabilidade de interseção pelo nucleófilo, ou seja, o DD, no nosso caso será intercetado pelo respetivo azole pirazole, indazole ou 1,2,4-triazole, formando o composto final desejado (Esquema 2) (52–54).



Esquema 2: Plano geral da síntese compostos azólicos

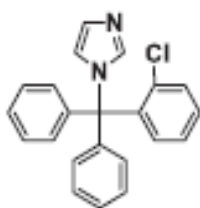
1.5.2. Compostos heterocíclicos

Os fármacos utilizados na medicina humana cobrem uma grande variedade de estruturas químicas, contudo a maior parte correspondem a pequenas moléculas heterocíclicas ou com componentes estruturais heterocíclicos. A família dos heterociclos é uma das mais importantes em química orgânica, sendo que essa importância se tem alargado para outros campos como o medicinal, antimicrobiano e industrial. O anel heterocíclico tem um papel fundamental tanto em moléculas biológicas, presentes naturalmente no corpo humano como o DNA, RNA, hemoglobina, etc. como a nível sintético, sendo exemplo as quinolonas. Os compostos heterocíclicos têm uma grande variedade de aplicações, tendo particularmente interesse na medicina, química e indústria farmacêutica (55).

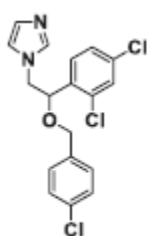
Os compostos azólicos são heterociclos aromáticos de cinco membros contendo um átomo de nitrogénio e pelo menos um outro átomo que poderá ser de nitrogénio, oxigénio ou

enxofre. Os azoles tem grande significância em farmacologia, pelas suas características de segurança, eficácia e biodisponibilidade. Uma das suas aplicações mais proeminentes é como antifúngicos, uma vez que antes da síntese dos primeiros azoles, as opções de tratamento para as IFs invasivas eram limitadas (37).

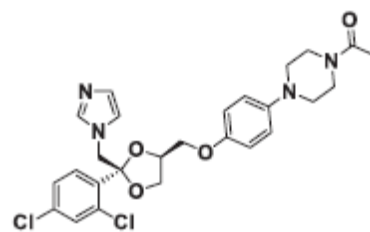
Os antifúngicos azólicos comercializados podem ser divididos em dois grupos, os imidazoles e os triazoles. Os primeiros azoles no mercado foram os derivados do imidazole, nomeadamente o clotrimazole, miconazole e mais tarde o econazole. Dos derivados imidazólicos, clotrimazole (33.2.1), econazole (33.2.3) e cetoconazole (33.2.14) serão talvez os mais representativos comercialmente, sendo que o único que pode ser utilizado a nível sistémico é o cetoconazole, atualmente é considerado como segunda linha devido ao estreito espetro de atividade e efeitos adversos significativos (Figura 6).



33.2.1 Clotrimazole



33.2.3 Econazole



33.2.14 Cetoconazole

Figura 6: Derivados do imidazole

Os derivados do 1,2,4-triazole têm sido utilizadas mais recentemente no tratamento de infeções fúngicas, diferem dos imidazoles por possuírem três nitrogénios no anel azólico. Os triazoles mais proeminentes são o itraconazole (33.2.19) e o fluconazole (33.2.15), sendo que a descoberta da molécula de fluconazole foi tão significativa que na atual procura por novos antifúngicos azólicos, a estrutura base da molécula do fluconazole com duas unidades alquiladas de 1,2,4-triazole é mantida, manipulando as outras possibilidades de modulação estrutural de modo a obter diferentes efeito terapêuticos (37,45,56,57).

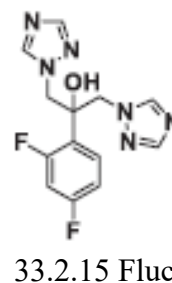
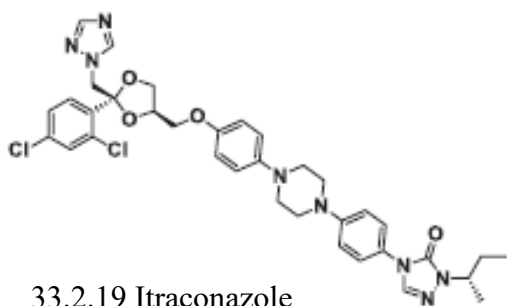
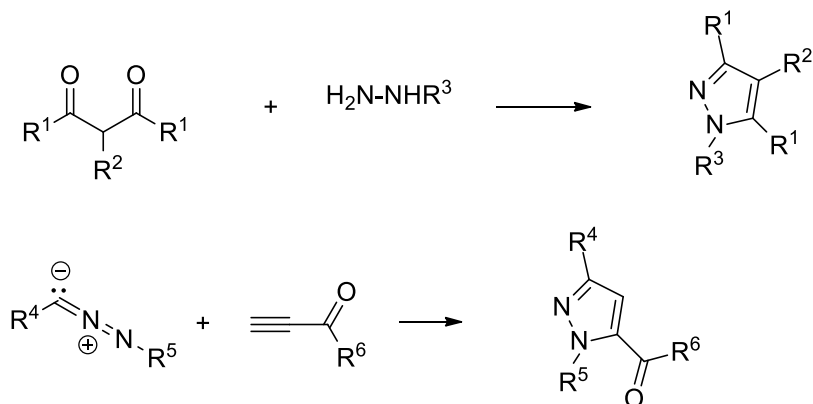


Figura 7: Derivados do 1,2,4-triazole

Existem também vários trabalhos na literatura que referem e evidenciam a relevância da atividade biológica de pirazoles, entre elas antibacteriana, anti-tumoral, anti-inflamatória e particularmente a atividade antifúngica (58,59). Os métodos clássicos para a síntese do núcleo pirazole envolvem essencialmente a condensação de compostos 1,3-dicarbonílicos com hidrazinas ou reações de ciclo-adição 1,3-dipolares entre dipolos azo-derivados e alcinos (55,60).



Esquema 3: Métodos de síntese do núcleo pirazole

1.6. Objetivo

O objetivo do presente trabalho incide no desenvolvimento e síntese de novos compostos azólicos com eventual atividade antifúngica, a partir de reações conjugadas 1,4 entre DDs e o respetivo núcleo azólico. Foi também objetivo do presente trabalho, efetuar uma análise

comparativa da eventual atividade antifúngica dos compostos sintetizados sobre várias leveduras, de modo a averiguar da influência dos diferentes núcleos azólicos e dos diferentes substituintes que as hidrazonas eram portadoras.

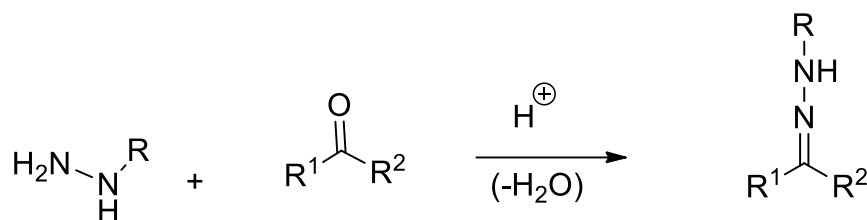
2. Materiais e métodos

2.1. Síntese dos precursores de reação

A síntese das hidrazonas e dos 1,2-diaza-1,3-dienos (DD) é a base para a preparação de novos compostos azólicos via reação conjugada 1,4. Tal como descrito anteriormente, esta reação acontece através da geração dos DD a partir da respetiva hidrazona, *in situ*, que permite ao DD ser intersetado pelo azole, numa reação de adição 1,4, formando o novo azole alquilado.

2.1.1. Síntese das hidrazonas

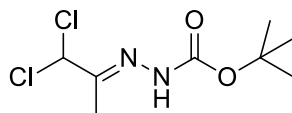
As hidrazonas foram sintetizadas partindo de diferentes cetonas (61). Em certos casos a protonação do oxigénio carbonílico, torna o carbono mais eletrofílico e assim mais suscetível ao ataque nucleófilo do azoto da hidrazina, facilitando a formação da hidrazona e tornando a reação mais rápida e eficiente (Esquema 4).



Esquema 4: Reação geral para obtenção de hidrazonas.

A hidrazona 2.1 foi sintetizada a partir da 1,1-dicloro acetona, a hidrazona 2.2 através da 1-cloro acetona e a hidrazona 2.3 através 1,3-dicloro acetona (Esquema 4) (61).

1,1-dicloroacetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (2.1)

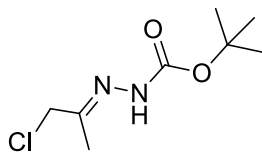


2.1

A 50 mL de éter etílico adicionou-se 1,55 g de *t*-butoxicarbonil hidrazina (11,7 mmol) e 1,2 mL de 1,1-dicloro acetona (12,0 mmol) e duas gotas de ácido acético. A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 16 h. Durante este período a hidrazona vai precipitando. Após filtração sob vácuo, lavagem com éter etílico frio e secagem, obtiveram-se 1,54 g de um sólido branco correspondente a um rendimento de 56%.

p.f. 130-132 °C. IV (KBr): 3197, 2983, 1708, 1537, 1253, 1144, 729 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.63 (s, 1H, NH), 6.39 (s, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.52 (s, 9H) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 156.7, 141.3, 80.7, 67.2, 26.3, 17.0 ppm.

1-Cloroacetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (2.2)

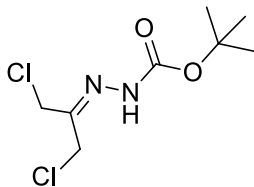


2.2

A uma solução de 30 mL de éter etílico e 10 mL de éter petróleo foi adicionado 1,55 g de hidrazina (11,7 mmol) e 1,0 mL de cloroacetona (12,4 mmol), e duas gotas de ácido acético. A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 18 h. O sólido precipitado foi filtrado sob vácuo, lavado com uma mistura de éter etílico e éter petróleo (3/1) fria e após secagem originou 1,15g de um sólido branco, com um rendimento de 48%.

p.f. 104-105 °C. IV (KBr): 3227, 3150, 2982, 1685, 1630, 1399, 1370, 1160, 729 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (s, 1H, NH), 4.20 (s, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.52 (s, 9H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 158.7, 154.6, 80.5, 43.2, 28.1, 17.4 ppm.

1,3-Dicloroacetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (2.3)

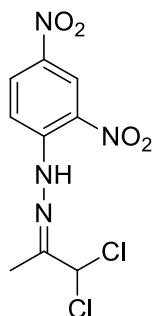


2.3

A uma solução de 15 mL de metanol e éter petróleo (10+5) adicionou-se *t*-butoxicarbonil hidrazina (1,32 g, 10 mmol) e de seguida 1,3-dicloro acetona (1,27 g, 10 mmol) e ácido acético (2 gotas). Quase de imediato se começa a verificar um precipitado. Após 3 h, filtrou-se o sólido sob vácuo, lavou-se com éter petróleo frio e secou-se. Obtiveram-se 2,01 gramas de um sólido levemente amarelado (83%).

p.f. 118-119.5°C. IV(KBr): 3330, 3220, 2983, 1729, 1707, 1680, 1542, 1371, 1277, 1155, 837 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8,34 (s, 1H), 4.32 (s, 4H), 1.38 (s, 9H), RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 158.3, 152.4, 80.1, 40.9, 36.4, 28.3 ppm.

1,1-Dicloroacetona 2,4-dinitrofenil hidrazona (2.4)



2.4

A uma suspensão de 2,4- dinitrofenilhidrazina (25% H₂O) (2,47 g, 12,5 mmol) em dietil fosfito (40 mL), adicionou-se 1,1-dicloro acetona (1,4 mL, 14 mmol). Após a adição verifica-se a solubilização da hidrazina. Depois de 4 h à temperatura ambiente adicionam-se 25 mL de água. O sólido alaranjado formado é filtrado sob vácuo e lavado éter petróleo. Após secagem obtêm-se 2,89 g da hidrazona (75 % rendimento).

p.f. 108-110 °C ; IV (KBr): 3319, 3094, 1617, 1594, 1514, 1338, 1288, 1105, 736 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.03 (s, 1H), 9.14 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.38 (m, 1H); 7.95 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 2.30 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 150.3, 116.8, 144.5, 139.3, 130.6, 130.2, 123.2, 72.5, 10.4 ppm.

2.1.2. Síntese dos compostos azólicos

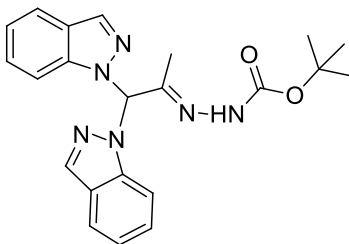
Os reagentes utilizados não sofreram nenhum tipo de purificação adicional desde a sua compra.

De modo a controlar as reações efetuadas foi utilizada cromatografia em camada fina (TLC) através de placas de alumínio revestidas com gel sílica 60 com 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência UV₂₅₄. A revelação das placas ocorreu por exposição de radiação U.V de 254 nm ou por oxidação em atmosfera de iodo.

Foi também utilizada cromatografia de flash seca (dry flash) para purificação dos compostos, utilizando-se sílica-gel de tipo G contendo 13% de sulfato de cálcio como a fase

estacionária sendo que o eluente varia de acordo com a polaridade do composto final.

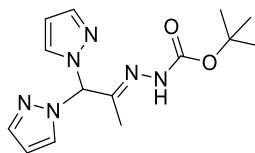
2.1.2.1. {[Metil-1-(*t*-butoxicarbonilhidrazono)]metil}-bis(1*H*-indazol-1-il)metano (CC2)



A 50 ml de DCM juntou-se 1,7 g de Na₂CO₃ (16 mmol), 0,6 g de indazole (4,8 mmol) e 0,386 g da 1,1-dicloroacetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (1,6 mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente sobre agitação constante durante 24 h. A fase orgânica foi recolhida e lavada com DCM. A evaporação do solvente seguida de cromatografia de flash usando como eluente CH₂Cl₂/acetato de etilo (3/1) e recolha e evaporação das frações desejadas resultou em 0,1258 g de um pó branco cristalino (η : 19,43%).

p.f. 125-126 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.08 (s, 1H), 8.54 (s, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.74 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 2H), 7.65 (dd, J = 8.8, 1.1 Hz, 2H), 7.29 (ddd, J = 8.8, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 7.12 – 7.00 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 148.2, 126.6, 125.2, 121.8, 121.2, 121.2, 117.3, 79.7, 79.1, 27.9, 14.0 ppm.

2.1.2.2. {[Metil-1-(*t*-butoxicarbonilhidrazono)]metil}-bis(1*H*-pirazol-1-il)metano (CC4)

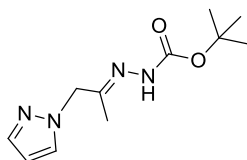


A 50 ml de DCM juntou-se 1,7 g de Na₂CO₃ (16 mmol), 0,33 g de pirazole (4,8 mmol) e 0,386 g da 1,1-dicloroacetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (1,6 mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente sobre agitação constante durante 24 h. Os insolúveis foram filtrados e a fase orgânica foi recolhida e evaporada. O resíduo foi sujeito a cromatografia de flash de

sílica utilizando como eluente CH₂Cl₂/acetato de etilo (3/1). A recolha e evaporação à secura das frações desejadas resultou em 0,3 g de um pó branco cristalino (η : 62%).

p.f. 159-161 °C. IV (KBr): 3437, 3212, 2978, 1734, 1713, 1539, 1393, 1369, 1290, 1242, 1177, 1150 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.62 (d, J = 2.1 Hz, 1 H), 7.60 (dd, J = 2.1, 0.6 Hz, 2 H), 7.52 (s, 1 H), 7.19 (br s, 1 H), 6.35 (t, J = 2.1 Hz, 1 H), 6.32 (dd, J = 2.5, 1.8 Hz, 2 H), 2.09 (s, 3 H), 1.53 (s, 9 H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 140.88, 130.11, 106.68, 105.00, 81.79, 78.60, 77.30, 77.04, 76.79, 28.19, 12.80 ppm.

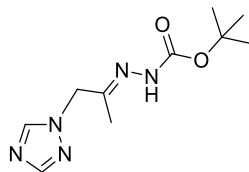
2.1.2.3. 1-(1*H*-pirazolil)acetona ^tbutoxicarbonil hidrazona (CC6)



A 50 ml de DCM juntou-se 1,7 g de Na₂CO₃ (16 mmol), 0,33 g de pirazole (4,8 mmol) e 0,33 g de 1-dicloroacetona ^tbutoxicarbonil hidrazona (1,6 mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente sobre agitação constante durante 24 h. A mistura foi filtrada através de uma camada de celite e esta bem lavada com acetato de etilo. O resíduo, após evaporação do solvente, foi sujeito a cromatografia de flash de sílica utilizando como eluente CH₂Cl₂/acetato de etilo (4/1). A evaporação do solvente das frações contendo o produto originaram 0,13 g de um sólido cristalino de cor branca. (η : 34%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.02 (s, 1H), 7.43 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.13 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.57 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 154.7, 144.3, 138.7, 129.8, 105.9, 80.5, 49.8, 28.3, 17.2 ppm.

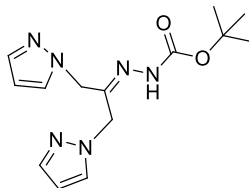
2.1.2.4. 1-(1*H*-(1,2,4)triazol-1-il)acetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (CC7)



A 50 ml de DCM juntou-se 1,7 g de Na₂CO₃ (16 mmol), 0,35 g de 1,2,4-triazole (4,8 mmol) e 0,33 g de 1-dicloroacetona *t*-butoxicarbonil-hidrazona (1,6 mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente sobre agitação constante durante 24 h. A fase orgânica foi filtrada sob celite e lavada com DCM e acetato de etilo. O resíduo, após evaporação do solvente, foi sujeito a cromatografia de flash de sílica utilizando como eluente CH₂Cl₂/acetato de etilo com polaridade crescente (5/1 até 3/2). A evaporação do solvente das frações contendo o produto originaram 0,12 g de um óleo amarelado. (η: 31.4%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 4.57 (s, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 154.7, 151.7, 144.9, 144.3, 80.5, 49.8, 28.3, 17.2 ppm.

2.1.2.5. 1,3-Bis-(1*H*-pirazolil)acetona *t*-butoxicarbonil hidrazona (CC8)



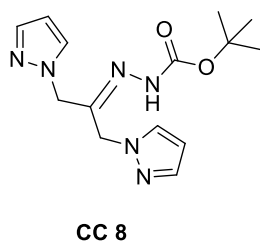
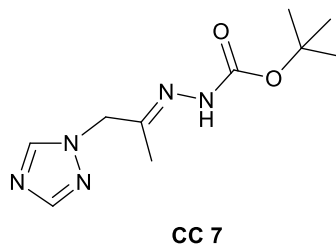
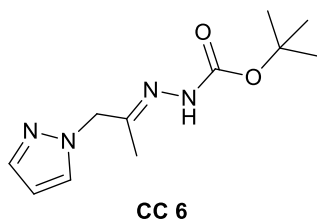
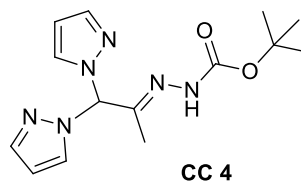
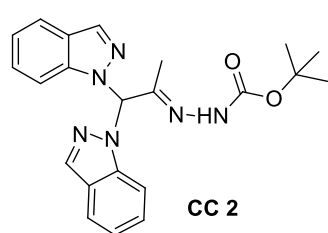
A 50 ml de DCM juntou-se 1,7 g de Na₂CO₃ (16 mmol), 0,33 g de pirazole (4,8 mmol) e 0,386 g da 1,3-dicloroacetona *t*-butoxicarbonil-hidrazona (1,6 mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente sobre agitação constante durante 24 h. A fase orgânica foi filtrada sob celite e lavada com DCM. Cromatografia de flash de sílica utilizando como eluente CH₂Cl₂/acetato de etilo (3/1). A evaporação à secura do solvente das frações contendo o produto originaram resultou em 0,205 g de um óleo amarelado. (η: 42%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,54 (s, 1H), 7.44 (dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 2H), 7.11 (dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 2H), 6.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.57 (s, 4H), 1.47 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 154.68, 138.73, 137.75, 129.77, 105.95, 80.48, 47.34, 46.58, 28.29 ppm.

2.1.2.6. Azole (CC10)

A 50 ml de DCM juntou-se Na_2CO_3 , azole e hidrazona. A reação ocorreu à temperatura ambiente sobre agitação constante durante 24 h. A fase orgânica foi filtrada e lavada com DCM. Cromatografia de flash conduziu à obtenção de um pó vermelho em placas.

p.f. 98-99.5 °C (dec.).



Azole

CC 10

Figura 8: Estrutura dos compostos sintetizados

2.2. Atividade antifúngica

De modo a avaliar a atividade antifúngica dos compostos sintetizados foi utilizado o método de Kirby-Bauer (difusão em agar) adaptado dos protocolos do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (62). Os microrganismos são inoculados na superfície do meio de cultura da placa de Petri. Posteriormente, os compostos a testar e os controlos são colocados sobre discos de papel, previamente dispostos sobre os microrganismos inoculados à superfície dos meios de cultura. Após o crescimento, é de esperar o aparecimento de um halo de inibição do crescimento em função da atividade dos compostos. As dimensões dos halos de inibição serão tanto maiores quanto mais elevada for a atividade antimicrobiana dos compostos (5,62).

2.2.1. Leveduras utilizadas

As espécies/estirpes de leveduras utilizadas no presente estudo foram *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Cryptococcus neoformans* (YPO 186), *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 3507), espécies relevantes no desenvolvimento de infeções fúngicas. Foram ainda testadas duas espécies associadas a situações de degradação alimentar, *Hanseniaspora uvarum* (PYCC 4110) e *Zygosaccharomyces bailii* (PYCC 4806). Foi também utilizada *Schizosaccharomyces pombe* (PYCC 2771) por ser uma das poucas espécies de leveduras cuja reprodução assexuada ocorre por fissão.

Prepararam-se suspensões das leveduras a testar, em tubos de 5 ml com solução salina (0,85% NaCl) estéril, tendo-se recolhido as colónias necessárias de modo a obter suspensões microbianas com uma turvação correspondente ao padrão 1 de Mc Farland (Biomérieux).

2.2.2. Meios de cultura e soluções de compostos

Os dois meios de cultura utilizados, Yeast Malt Agar (HIMEDIA) e Mueller-Hinton, (Scharlau) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. O meio Mueller Hinton foi suplementado com 2% de glucose. Os meios foram esterilizados a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos em autoclave e distribuídos nas caixas de Petri até solidificarem. Posteriormente, foram armazenados em refrigeração (4 °C) até à sua utilização para crescimento microbiano

As espécies *C. albicans* (ATCC 10231 e ATCC 90028) e *C. neoformans* (YPO 186) foram testadas no meio de cultura Mueller-Hinton. As leveduras *S. cerevisiae* (PYCC 3507), *H. uvarum* (PYCC 4110), *Z. bailii* (PYCC 4806) e *S. pombe* (PYCC 2771), foram testadas no meio de cultura Yeast Malt Agar.

Preparação das soluções dos compostos previamente sintetizados: Foram preparadas duas concentrações dos compostos a serem estudados, 10 mg/ml e 5 mg/ml.

- Concentração de 10 mg/ml (200 µg): foi pesado de cada composto 20 mg (0.02 g), diretamente em tubos eppendorf, os quais foram dissolvidos em 2 ml de DMSO, resultando numa concentração de 10 mg/ml. Após a diluição, procedeu-se à agitação dos tubos para homogeneizar a solução.
- Concentração de 5mg/ml (100 µg): foi pesado de cada composto 10 mg (0.01 g), diretamente em tubos eppendorf os quais foram dissolvidos em 2 ml de DMSO, resultando numa concentração de 5 mg/ml. Após a diluição, procedeu-se à agitação dos tubos para homogeneizar a solução.

2.2.3. Aplicação do método Kirby-Bauer

As placas de Petri com os respetivos meios de cultura foram inoculadas utilizando zaragatoas estéreis, que foram mergulhadas nas suspensões de leveduras preparadas anteriormente. Após a inoculação realizada em três eixos de inoculação, colocou-se em cada quadrante da placa discos de papel (6 mm de diâmetro) (Oxoid), esterilizados (Figura 8). Os

discos foram impregnados com 20 μL de ambas as concentrações (10 mg/ml e 5 mg/ml) de cada um dos compostos em estudo de modo a obter o equivalente a 200 μg e 100 μg de composto na placa.

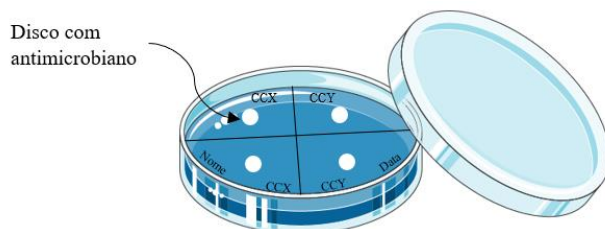


Figura 9: Representação esquemática de uma placa de Petri com os discos de papel

Foram utilizados dois compostos antifúngicos como controlos positivos, a anfotericina B, (10 μg), (Diagnostici Liofilchem) e o fluconazole (25 μg), (Diagnostici Liofilchem). Foram também utilizados como controlos o DMSO e a solução salina.

As placas inoculadas foram incubadas a 30 $^{\circ}\text{C}$, durante 48 h. Após este período, observou-se a presença de halos de inibição do crescimento microbiano, mediu-se o diâmetro dos mesmos (milímetros) e calculou-se médias e desvios-padrão. Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

3. Resultados e discussão

A atividade antifúngica dos compostos derivados de azoles sintetizados, no crescimento de leveduras (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, e *Schizosaccharomyces pombe*) foi estudada utilizando um método adaptado da técnica Kirby-Bauer (difusão em ágar). Para tal, após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição do crescimento das leveduras em meio de cultura sólido. Os resultados observados quando se utilizou a concentração mais elevada (10 mg/ml – 200 µg de composto) dos compostos não foram significativamente diferentes dos resultados registados com a concentração mais baixa (5 mg/ml – 100 µg de composto).

Assim, na Tabela 5 apresentam-se os resultados dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das leveduras na presença dos compostos em estudo na concentração 5 mg/ml.

Tabela 5: Halos de inibição do crescimento das leveduras induzidas pelos compostos/controles. Os valores representam médias±desvios-padrão do diâmetro dos halos inibitórios (mm); (-): ausência de halo; fluconazole (Flu); anfotericina B (AnfB); Compostos em estudo [5 mg/ml (100 µg)].

Leveduras	DMSO/ NaCl	Flu 25µg	AnfB 10µg	CC2 100µg	CC4 100µg	CC6 100µg	CC7 100µg	CC8 100µg	CC10 100µg
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	15,67±1,63	8,00±0,00	-	-	-	-	13,30±0,94
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	-	22,33±1,89	20,67±0,94	-	-	5,67±4,30	-	-	14,00±0,82
<i>C. neoformans</i> (YPO 186)	-	20,67±0,94	13,00±1,63	10,33±0,47	6,67±4,71	-	-	2,30±3,30	15,70±1,15
<i>S. cerevisiae</i> (PYCC 3507)	-	19,67±1,25	10,67±0,94	6,00±4,32	-	-	-	-	17,30±1,25
<i>H. uvarum</i> (PYCC 4110)	-	-	10,00±0	-	-	-	-	-	18,00±0,00
<i>Z. bailii</i> (PYCC 4806)	-	-	12,5±0,5	-	-	-	-	-	16,50±0,50
<i>S. pombe</i> (PYCC 2771)	-	31,50±0,50	18,5±0,5	-	-	-	-	-	21,00±0,00

A observação da Tabela 5 permite constatar que os controles positivos utilizados inibiram de forma diferenciada as leveduras testadas. O fluconazole não inibiu o crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231), *H. uvarum* (PYCC 2489) e *Z. bailii* (PYCC 4806) e a anfotericina B, causou inibição em todas as leveduras utilizadas. As diferenças poderão justificar-se com base no modo de inibição da anfotericina B em conjunto com a fisiologia das leveduras. Por exemplo, a presença de cápsula e a estrutura e composição da parede celular podem afetar o acesso do polieno aos seus alvos celulares, uma vez que o mecanismo de ação da anfotericina B ainda não está totalmente esclarecido. As leveduras de degradação alimentar, *H. uvarum*, *Z. bailii*, e a espécie *S. pombe* demonstraram ser mais tolerantes à anfotericina B do que *C. albicans*. No entanto, *S. pombe* é muito sensível ao fluconazole.

O substituinte 1,2,4-triazole, presente na molécula CC7 não terá vantagem sobre o pirazole, presente na molécula CC6, sendo que este resultado aponta em sentido contrário às evidências da literatura da prática clínica, onde o núcleo 1,2,4-triazole se encontra presente nos fármacos mais recentes e utilizados tais como o itraconazole e o fluconazole. Assim pode-se concluir que a molécula CC6, apesar de ter atividade antifúngica, não apresenta benefício significativo em relação à molécula CC7.

Por outro lado, a presença de dois núcleos de pirazole, tal como acontece na molécula CC4, como tal um derivado bis pirazolil metano, não apresentou diferenças significativas em relação à CC6, esta portadora de um só núcleo de pirazole – sendo a restante cadeia alquílica e hidrazono a mesma. Poderá assim concluir-se que a presença de dois núcleos pirazole não influencia positivamente a atividade antifúngica.

Dentro dos bis-azoles a variação dos núcleos pirazole, das posições alquílicas de 1,1 para 1,3 não trará vantagens, uma vez que não existem diferenças significativas na atividade como observado quando comparamos a molécula CC4 com a CC8. Esta falta de eficácia pelas moléculas com núcleo pirazole permitirá concluir que este azole em particular tanto em mono-adição como bis-adição não traz qualquer mais-valia para a atividade antifúngica das moléculas.

Noutra perspetiva, a molécula CC2 também constituída por dois núcleos azólicos, mas neste caso com uma funcionalização bis-indazolil metano, apresenta atividade significativamente maior, quando comparada com a molécula CC4, funcionalizada com bis-pirazolil metano. Estes dados poderão levar à conclusão de que o núcleo azólico indazole será o responsável pela acrescida atividade da molécula CC2, uma vez que a hidrazona presente em ambas as moléculas é a mesma.

Sob outra perspetiva, a molécula CC10 apresenta atividade antifúngica relevante, sendo que a estrutura desta molécula mimica parcialmente algumas estruturas de fármacos azólicos conhecidos, onde a presença de um substituinte aromático com dois núcleos azólicos parece ser a chave para a uma atividade antifúngica valorizável.

Em suma, a presença de dois núcleos azólicos não é significativa por si só, ou seja, depende principalmente do azole utilizado, sendo que perante os resultados deste trabalho o

núcleo indazole demonstrou ser o mais eficiente. No substituinte da hidrazona, em linha com azoles já conhecidos a presença de um grupo aromático será potenciador da atividade antifúngica.

4. Conclusão e perspectivas futuras

Perante os resultados obtidos relativamente à atividade antifúngica apresentada pela molécula CC10, seria interessante fazer alterações de funcionalidades estruturais no substituinte aromático da hidrazona de partida, como por exemplo a introdução de halogéneos em lugar do grupo nitro ou ainda o estudo de substituintes heteroaromáticos ou sulfonilo. Outro ângulo de eventual modulação da molécula seria no sentido de averiguar, comparando com o estudo realizado, se a presença de um só núcleo azólico, portanto uma molécula mono-indazolilmetano ou similarmente a presença de três núcleos – tris-indazolilmetano conduziria a resultados de atividade antifúngica superiores ou inferiores aos obtidos com o bis-indazolilmetano. Numa outra abordagem, seria pertinente utilizar núcleos azólicos, nomeadamente indazoles também estes portadores de halogéneos no anel benzénico. A substituição do grupo metilo no carbono C2 da cadeia alifática, por um grupo fenilo ou p-bromofenilo – partindo de derivados da benzofenona – ou hetero-aromático, poderia também ser um caminho a investigar no sentido de poder proporcionar uma melhor atividade antifúngica.

Seria interessante utilizar outro método de avaliação de atividade antimicrobiana, como o crescimento microbiano em meio líquido para determinação da sensibilidade/resistência das leveduras aos compostos sintetizados. O método de Kirby-Bauer, utilizado para a determinação da atividade antifúngica, possui algumas limitações sendo elas a dificuldade de ajuste da concentração microrganismos na suspensão celular (padrões de McFarland), e a dificuldade de uniformização da inoculação das placas de Petri, o que resulta em dificuldades na leitura dos resultados. A utilização de outras espécies de fungos também é um caminho pertinente a explorar. Neste trabalho apenas foram testadas leveduras, pelo que a utilização de fungos filamentosos (dermatófitos e *Aspergillus spp*), que se comportam de forma diferente, são uma alternativa a explorar para avaliar a eficácia do composto CC10.

Relativamente à crise das resistências aos azoles, o controlo desta problemática deverá assentar em estratégias globais, com aplicação de novas técnicas de diagnóstico, novos antifúngicos, terapias combinadas, menor utilização dos compostos azólicos (em aplicações não terapêuticas) e o desenvolvimento da imunoterapia. A investigação e constante procura

por soluções é essencial e indispensável para diminuir a mortalidade associada às infecções fúngicas, aumentar a qualidade de vida e principalmente fornecer alternativas para a atual terapêutica antifúngica disponível no mercado

Referências Bibliográficas

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 8th ed. Elsevier Editora Ltda, editor. 2017.
2. Ignacio Uriel Macias-Paz, Salvador Pérez-Hernández, Alejandra Tavera-Tapia, Juan Pedro Luna-Arias, José Eugenio Guerra-Cárdenas, Elizabeth Reyna-Beltrán. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología* 55. 2023;55:189–98.
3. Ali A. Rabaan, Khalid Eljaaly, Wadha A. Alfouzan, Abbas Al Mutair, Saad Alhumaid, Amal H. Alfaraj, et al. Psychogenetic, genetic and epigenetic mechanisms in *Candida auris*. *Journal of Infection and Public Health*. 2023;(15):257–63.
4. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. Vol. 133, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2017. p. 86–96.
5. Fan FM, Liu Y, Liu YQ, Lv RX, Sun W, Ding WJ, et al. *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. Vol. 60, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2022.
6. Kainz K, Bauer MA, Madeo F, Carmona-Gutierrez D. Fungal infections in humans: the silent crisis. 2020 [cited 2023 Feb 23];7(6). Available from: www.microbialcell.com
7. Kumaresan PR, da Silva TA, Kontoyiannis DP. Methods of controlling invasive fungal infections using CD8+ T cells. *Front Immunol*. 2018 Jan 8;8(DEC).
8. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*. 2017 May 19;5(3).
9. Whalen K. FR, PT. *Livro_Farmacologia_Ilustrada*. 6^a ed Porto Alegre. 2016;
10. Klis FM, De Groot P, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology* . 2001;Supplement 1:1–8.
11. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Feb;51(2):510–20.
12. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiol*. 2006 Aug;55(8):999–1008.
13. Lenardon D. M, Sood P, Dorfmüller C. H, Brown J. P. A, Gow A.R. N. Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular. *The Cell Surface* . 2020;6.

14. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
15. Murphy A, Kavanagh K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen Implications for biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology* . 1999;(25):551–7.
16. Stewart GG. *Saccharomyces: Saccharomyces cerevisiae*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2014. p. 309–15.
17. Muñ OZ P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, María Eiros J, Jesús Pérez M, Sánchez-Somolinos M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases* [cited 2023 Jun 26]. 2005;1625. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/40/11/1625/445600>
18. Liu W, Li L, Ye H, Chen H, Shen W, Zhong Y, et al. From *Saccharomyces cerevisiae* to human: The important gene co-expression modules. *Biomed Rep*. 2017 Aug 1;7(2):153–8.
19. Anwar MI, Muhammad F, Awais MM, Akhtar M. A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. Vol. 73, *World's Poultry Science Journal*. Cambridge University Press; 2017. p. 651–61.
20. Sudarshan Singh Rathore, Jananishree Sathiyamoorthy, Cheepurupalli Lalitha, Jayapradha Ramakrishnan. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microbial Pathogenesis* . 2022;(166).
21. Mukaremera L, Lee KK, Wagener J, Wiesner DL, Gow NAR, Nielsen K. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *Cell Surface*. 2018 Mar 1;1:15–24.
22. Baker LG, Specht CA, Lodge JK. Cell wall chitosan is necessary for virulence in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans*. Vol. 10, *Eukaryotic Cell*. 2011. p. 1264–8.
23. Su J, Zhu B, Inoue A, Oyama H, Morita I, Dong J, et al. The Patrol Yeast_ A new biosensor armed with antibody-receptor chimera. *Biosens Bioelectron*. 2023;(219).
24. Riesute R, Slomskiene J, Moreno DS, Gustiene S. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science & Technology* . 2021;(108):1–10.
25. Su J, Zhu B, Inoue A, Oyama H, Morita I, Dong J, et al. The Patrol Yeast: A new biosensor armed with antibody-receptor chimera detecting a range of toxic substances associated with food poisoning. *Biosens Bioelectron*. 2023 Jan;219:114793.

26. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security [cited 2023 Jun 29]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
27. Kreger-van Rij. The yeasts a taxonomic study. Third edition. Elsevier Science Publishing Company, editor. 1984.
28. Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. Vol. 5, Frontiers in Medicine. Frontiers Media S.A.; 2018.
29. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. Journal of Fungi. 2021 Feb 1;7(2):1–19.
30. Oztekin S, Dikmetas DN, Devecioglu D, Acar EG, Karbancioglu-Guler F. Recent Insights into the Use of Antagonistic Yeasts for Sustainable Biomanagement of Postharvest Pathogenic and Mycotoxigenic Fungi in Fruits with Their Prevention Strategies against Mycotoxins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2023 Jul 5;
31. Sá-Correia I, Guerreiro JF, Loureiro-Dias MC, Leão C, Côrte-Real M. *Zygosaccharomyces*. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. 2014 Apr 2;849–55.
32. Sabatino SA, Forsburg SL. Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol. 2010;470(C):759–95.
33. Principais infeções fúngicas invasivas e respetivo tratamento - Parte 2. Centro de informação do medicamento . 2022;
34. Tagliaferri E, Menichetti F. Treatment of invasive candidiasis: Between guidelines and daily clinical practice. Vol. 13, Expert Review of Anti-Infective Therapy. Expert Reviews Ltd.; 2015. p. 685–9.
35. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. Jornal Brasileiro Pneumologia. 2006;32(5):449–60.
36. Rogers TR, Verweij PE, Castanheira M, Dannaoui E, Lewis White P. Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2022;77(8):2053–73.
37. Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. Vol. 13, Expert Review of Anti-Infective Therapy. Expert Reviews Ltd.; 2015. p. 787–98.

38. Tirona RG, Kim RB. Introduction to Clinical Pharmacology. In: Clinical and Translational Science: Principles of Human Research: Second Edition. Elsevier Inc.; 2017. p. 365–88.
39. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Vol. 138, Pharmacology and Therapeutics. 2013. p. 103–41.
40. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic and clinical pharmacology. 12th ed. 2012. p. 849–859
41. Maertens JA, Boogaerts MA. Fungal Cell Wall Inhibitors: Emphasis on Clinical Aspects. Current Pharmaceutical Design. 2000;6:225–39.
42. Reddy GKK, Padmavathi AR, Nancharaiyah Y V. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. Current Research in Microbial Science. 2022 Jan 1;3.
43. Branco J, Fonseca E, Gomes NC, Martins-Cruz C, Silva AP, Silva-Dias A, et al. Impact of *ERG3* mutations and expression of ergosterol genes controlled by UPC2 and NDT80 in *Candida parapsilosis* azole resistance. Clinical Microbiology and Infection. 2017 Aug 1;23(8):575.e1-575.e8.
44. Ha YS, Covert SF, Momany M. FsFKS1, the 1,3- β -glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. Eukaryot Cell. 2006 Jul;5(7):1036–42.
45. Shafiei M, Peyton L, Hashemzadeh M, Foroumadi A. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. Vol. 104, Bioorganic Chemistry. Academic Press Inc.; 2020.
46. Lopes SMM, Cardoso AL, Lemos A, Pinho E Melo TMVD. Recent Advances in the Chemistry of Conjugated Nitrosoalkenes and Azoalkenes. Vol. 118, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2018. p. 11324–52.
47. Grosso C, Lemos A, Pinho E Melo TMVD. Conjugate addition of pyrazoles to halogenated nitroso- and azoalkenes: A new entry to novel bis(pyrazol-1-yl)methanes. Synlett. 2014;25(21).
48. Lyapkalo IM, Ioffe SL. Conjugated nitroso alkenes. Usp Khim. 1998;67(6):539–41.
49. Lemos A. Addition and cycloaddition reactions of phosphinyl- and phosphonyl-2H-azirines, nitrosoalkenes and azoalkenes. Vol. 14, Molecules. 2009. p. 4098–119.
50. Lemos A. Cycloaddition reactions of conjugated azoalkenes. Targets in Heterocyclic Systems . 2010;(14):1–18.

51. Lemos A, Lourenço JP. Cycloaddition reactions of nitrosoalkenes, azoalkenes and nitrile oxides mediated by hydrotalcite. *ARKIVOC*. 2010;170–82.
52. Grosso C, Liber M, Brigas AF, Pinho E Melo TMVD, Lemos A. Regioselectivity in Hetero Diels-Alder Reactions. *Journal of Chemical Education*. 2019 Jan 8;96(1):148–52.
53. Kanzian T, Nicolini S, De Crescentini L, Attanasi OA, Ofial AR, Mayr H. Electrophilic reactivities of 1,2-diaza-1,3-dienes. *Chemistry - A European Journal*. 2010 Oct 18;16(39):12008–16.
54. Spinelli D, Attanasi OA, De Crescentini L, Filippone P, Mantellini F, Santeusano S. 1,2-Diaza-1,3-butadienes; just a nice class of compounds, or powerful tools in organic chemistry? Reviewing an experience. *ARKIVOC*. 2022;274–92.
55. Joule JA, Mills K. *Heterocyclic Chemistry, Fifth Edition*. 5th ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2010.
56. Shukla PK, Singh P, Yadav RK, Pandey S, Bhunia SS. Past, present, and future of antifungal drug development. In: *Topics in Medicinal Chemistry*. Springer Verlag; 2018. p. 125–67.
57. Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: A review. Vol. 51, *Drugs of Today*. Prous Science; 2015. p. 705–18.
58. Faria JV, Vegi PF, Migueta AGC, dos Santos MS, Boechat N, Bernardino AMR. Recently reported biological activities of pyrazole compounds. Vol. 25, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd; 2017. p. 5891–903.
59. Zhang CY, Liu XH, Wang BL, Wang SH, Li ZM. Synthesis and antifungal activities of New pyrazole derivatives via 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *Chemical Biology and Drug Design*. 2010 May;75(5):489–93.
60. Synthesis of Difluoromethylated Pyrazoles by the [3 + 2] Cycloaddition Reaction of Difluoroacetylhydrazonoyl Bromides. *Journal of Organic Chemistry*. 2022 Dec 16;87(1):498–511.
61. Kölmel DK, Kool ET. Oximes and hydrazones in bioconjugation: mechanism and catalysis. Vol. 117, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2017. p. 10358–76.
62. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Vol. 6, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd.; 2000. p. 503–8.