



**Síntese de bisindolilmetanos via reações de ciclo-adição hetero
Diels-Alder e as suas aplicações biológicas como antimicóticos**

João Manuel Lopes Domingos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Américo Lemos

Professora Doutora Célia Quintas

2024



**Síntese de bisindolilmetanos via reações de ciclo-adição hetero
Diels-Alder e as suas aplicações biológicas como antimicóticos**

João Manuel Lopes Domingos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Américo Lemos

Professora Doutora Célia Quintas

2024

Síntese de bisindolilmetanos via reações de ciclo-adição hetero Diels-Alder e as suas aplicações biológicas como antimicóticos

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser o autor 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, de 2024

©2024 João Manuel Lopes Domingos

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

Em primeiro lugar, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento ao Prof. Américo Lemos e à Prof.^a Célia Quintas por todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho, bem como pelo valioso conhecimento partilhado. Foi uma honra trabalhar com ambos.

Devo também agradecer aos diversos docentes do curso, que se destacaram pela sua generosidade e apoio ao longo destes anos, assim como a todos os elementos envolvidos na minha orientação durante o estágio na Farmácia Caniné e no Hospital de Faro, por me proporcionarem uma experiência de aprendizagem extraordinária.

À minha família: ao meu pai, Artur, e às minhas segundas mães, Nádía e Natacha, pelo incalculável apoio e pelos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse chegar onde estou hoje, e por me ajudarem a tornar-me no homem que sou.

Ao meu padrinho, Godinho, que foi imprescindível e um verdadeiro irmão ao longo de todo o meu percurso académico, sendo, até hoje, um suporte fundamental nos momentos de crise, e a quem devo muito.

Aos meus parceiros de estudo mais próximos, Pereira, Ricardo, Roman, Tarek e Tiago, pela motivação nos momentos árduos de estudo e pelas paródias que partilhámos.

Aos meus amigos, Rui e António, que, há já uma década, me proporcionam inúmeros momentos de diversão e são, para mim, uma verdadeira fonte de conhecimento.

E, por fim, à minha sobrinha, Ofélia, a quem dedico este trabalho com especial carinho.

Resumo

Os derivados indólicos associam-se a uma classe de alcalóides bioativos, caracterizados por apresentarem uma estrutura simples, baixa toxicidade e propriedades biológicas e farmacológicas de interesse, tais como antibacterianas, anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias.

Entre os diversos derivados, os bisindolilmetanos (BIMs) são compostos cujas origens na natureza predominam como agentes metabólitos bioativos, encontrados em ambiente terrestre e marinho, presentes em determinadas plantas e esponjas. A nível clínico, exibem uma extensa aplicação, como antibióticos contra uma diversidade de diferentes espécies (*Vibrindole A*) e anticancerígeno (*Trisindolina*). Nos últimos anos, tem-se descoberto novos BIMs que apresentam atividade antimicrobiana prometedora, podendo assim ser considerados como potenciais novos fármacos.

O uso prolongado de determinados antifúngicos azólicos, em que está incluído o fluconazole, podem conduzir ao desenvolvimento de resistências em leveduras patogênicas, sendo necessário que se recorra a uma terapia combinada como forma de potencialmente superar esta inconveniência. Logo, investigações que possam conduzir a novos compostos que consigam eficazmente produzir uma atividade terapêutica sem que surjam problemas relacionados com resistência medicamentosa ou com reações adversas muito comuns entre eles, são cruciais.

Presentemente, as vias de síntese mais prevalentes envolvem a reação de indoles com vários compostos carbonílicos ou equivalentes, catalisada por ácidos ou metais. Recentemente, a reação de ciclo-adição hetero-Diels-Alder, baseadas na dupla e consecutiva interseção de azo- e nitroso-alcenos conjugados com indoles provou ser uma alternativa de síntese versátil e de larga aplicação na preparação de BIMs.

O objetivo desta monografia foi investigar a capacidade antimicótica de BIMs sintetizados, no âmbito deste estudo, com base em reações de ciclo-adição hetero-Diels-Alder. Assim os BIMs obtidos foram aplicados em ensaios biológicos, e comparada a sua eficácia contra três espécies de leveduras, *Candida albicans* (ATCC 90028 e 10231), *Cryptococcus neoformans* (YPO 186) e *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 3507) e três antimicóticos utilizados no tratamento de patologias originadas por estas leveduras (Anfotericina B, Nistatina e Fluconazole).

Palavras-Chave: bisindolilmetanos, oxima, hidrazona, reação de Diels-Alder, antimicótico, anfotericina A, nistatina, fluconazole

Abstract

Indole derivatives are associated with a class of bioactive alkaloids, characterized by their simple structure, low toxicity, and biological and pharmacological properties of interest, such as antibacterial, anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory activities.

Among the various derivatives, bis(indolyl)methanes (BIMs) are compounds primarily found in nature as bioactive metabolic agents, present in terrestrial and marine environments, particularly in certain plants and sponges. Clinically, they exhibit extensive applications, such as antibiotics against a variety of species (e.g., Vibrindole A) and as anticancer agents (e.g., Trisindoline). In recent years, new BIMs with promising antimicrobial activity have been discovered, making them potential candidates for new drug development.

The prolonged use of certain azole antifungals, including fluconazole, can lead to the development of resistance in pathogenic yeasts, necessitating combined therapy to potentially overcome this issue. Therefore, research aimed at discovering new compounds capable of producing effective therapeutic activity without the emergence of drug resistance or common adverse reactions is crucial.

Currently, the most prevalent synthesis pathways involve the reaction of indoles with various carbonyl compounds or equivalents, catalyzed by acids or metals. Recently, hetero-Diels-Alder cycloaddition reactions, based on the dual and consecutive intersection of azo- and nitroso-alkenes conjugated with indoles, have proven to be a versatile and widely applicable synthetic alternative for the preparation of BIMs.

The objective of this monograph was to investigate the antifungal capacity of BIMs synthesized in this study, based on hetero-Diels-Alder cycloaddition reactions. The synthesized BIMs were applied in biological assays, and their efficacy was compared against three yeast species of *Candida albicans* (ATCC 90028 and 10231), *Cryptococcus neoformans* (YPO 186) and *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 3507), and three antifungal agents used in the treatment of yeast-related pathologies (Amphotericin B, Nystatin, and Fluconazole).

Keywords: Bis(indolyl)methanes, oxime, hydrazone, Diels-Alder reaction, antimycotic, amphotericin A, nystatin, fluconazole

Índice Geral

Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Índice de esquemas	9
Índice de figuras.....	10
Índice de tabelas.....	11
Abreviaturas	12
1. Introdução	13
1.1. Relevância clínica dos compostos indólicos.....	13
1.1.1. Indoles.....	13
1.1.2. Bisindolilmetanos	15
1.2. Estratégias de síntese de compostos indólicos.....	17
1.2.1. Promotores de síntese	17
1.2.2. Estratégias iniciais	17
1.2.3. Reação de Friedel-Crafts.....	18
1.2.4. Reação de hetero Diels-Alder	18
1.2.5. Síntese de bisindolilmetanos via reação de hetero Diels-Alder.....	27
1.3. Agentes antifúngicos.....	32
1.3.1. Fungos.....	32
1.3.2. Espécies fúngicas utilizadas no presente estudo: <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
1.3.3. Fatores de virulência.....	40
1.3.4. Infecções fúngicas humanas	41
1.3.5. Agentes antifúngicos.....	44
1.3.6. Compostos antifúngicos em desenvolvimento.....	46
1.4. Objetivo.....	47
2. Materiais e métodos	49
2.1. Síntese da oxima e das hidrazonas precursores de nitroso- e azo-alcenos	49
2.1.1. 1,1-dicloroacetona oxima (63).....	50
2.1.2. 1,1-dicloroacetona <i>t</i> -butoxicarbonil-hidrazona (64)	50
2.1.3. 1,1-dicloroacetona 2,4-dinitrofenil-hidrazona (65).....	51

2.1.4.	1,1-dicloroacetona <i>p</i> -toluenosulfonil-hidrazona (66)	51
2.2.	Síntese dos BIMs	52
2.2.1.	1-(1-Hidroxiimino)etil bis(3-indolil)metano (67) (C10)	52
2.2.2.	1-[(1- ^t butoxicarbonilhidrazono)]etil bis(3-indolil)metano (68) (C1).....	53
2.2.3.	1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]etil bis(3-indolil)metano (69) (C2)	54
2.2.4.	1-[1-(<i>p</i> -Toluenosulfonilhidrazono)]etil bis(3-indolil)metano (70) (C3).....	55
2.3.	Outros compostos testados.....	55
2.3.1.	1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]etil bis(1-pirazolil)metano (71) (C4)	56
2.3.2.	1-[1-(<i>p</i> -Toluenosulfonilhidrazono)]etil bis(1-pirazolil)metano (72) (C7)	56
2.3.3.	{4-bromofenil-1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]}etil bis(1-pirazolil)metano (73) (C5 e C6).....	57
2.3.4.	1-[1-(<i>p</i> -Toluenosulfonilhidrazono)]etilbis[1-(1,2,4-triazolil)]metano (74) (C8)..	57
2.3.5.	{4-bromofenil-1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]}etil bis[1-(1,2,4-triazolil)metano (75) (C9).....	58
2.4.	Atividade antifúngica.....	58
2.4.1.	Fungos testados	59
2.4.2.	Meios de cultura e soluções de compostos	59
2.4.3.	Método Kirby-Bauer	59
3.	Resultados e discussão	62
4.	Conclusão e perspectivas futuras	64
	Referências bibliográficas.....	65

Índice de esquemas

Esquema 1. 1 Reação de alquilação Friedel-Crafts entre indole e aldeído ou cetona na síntese de BIMs	18
Esquema 1. 2 As duas classes de reação de cicloadição HDA: (A) normal; (B) inversa	19
Esquema 1. 3 Ação do ácido de Lewis sobre as orbitais atômicas envolvidas na reação cicloadição HDA: (A) normal; (B) inversa.....	20
Esquema 1. 4 As típicas reações em que os azo- e nitrosoalcenos encontram-se envolvidos: (A) HDA; (B) adição-1,4 conjugada	21
Esquema 1. 5 Geração de Azo- e Nitroso-alcenos via desidrohalogenação	22
Esquema 1. 6 Preparação de derivados de 1,2-oxazina via HDA.....	22
Esquema 1. 7 Preparação de derivados de piridazina HDA	23
Esquema 1. 8 Reações HDA, entre azoalcenos e furano e 2,5-dimetilfurano	23
Esquema 1. 9 Reações de HDA de tetrahidropiridazinas e cicloadutos com cadeia aberta.....	24
Esquema 1. 10 Reação de cicloadição HDA entre azo- e nitrosoalcenos C-3 e índoles.....	25
Esquema 1. 11 Síntese de análogos do triptofano derivados de nitroviniltetrazóis	26
Esquema 1. 12 Sequência sintética para obtenção de 3-tetrazolil- β -carbolinas	27
Esquema 1. 13 Estratégia geral de síntese de BIMs via reações bis-hetero Diels-Alder.....	28
Esquema 1. 14 Estratégia de síntese de hidroximinio BIMs via reações bis-hetero Diels-Alder.	29
Esquema 1. 15 Estratégia de síntese de hidrazonas derivadas de diclorohidrazona via reações bis-hetero Diels-Alder.....	30
Esquema 1. 16 Estratégia de síntese de hidrazonas derivadas de α,α' -dihalohidrazonas via reações bis-hetero Diels-Alder.....	30
Esquema 1. 17 Estratégia de síntese de hidrazonas via reações bis-hetero Diels-Alder a partir de azoalcenos que apresentam o grupo tosilo e 2,4-dinitrofenilo.....	31
Esquema 1. 18 Estratégia de síntese de BIMs via reações bis-hetero Diels-Alder a partir de α,α' -diclorohidrazonas e indoles.....	32
Esquema 2. 1 Estratégia geral para a preparação de oximas e hidrazonas.....	49
Esquema 2. 2 Método geral de preparação dos BIMs	52

Índice de figuras

Figura 1. 1 Estrutura do indole	13
Figura 1. 2 Diferentes derivados indólicos existentes na natureza: (a) triptofano; (b) serotonina; (c) bufotenina; (d) psilocibina.....	13
Figura 1. 3 Diferentes fármacos comercializados que contêm indole na sua composição: (e) vimblastina; (f) delavirdina; (g) oxipertina; (h) amedalina; (i) zafirlucaste; (j) indometacina; (k) perindopril; (l) tadalafil.....	14
Figura 1. 4 Estrutura química do BIM.....	15
Figura 1. 5 Diferentes derivados BIM existentes na natureza: (m) streptindole; (n) vibrindole A; (o) trisindolina; (p) arsindole A; (q) arsindole B	16
Figura 1. 6 Estrutura e numeração de azo- e nitrosoalceno	20
Figura 1. 7 Representação esquemática da célula fúngica [adaptado de (64)]	33
Figura 1. 8 Classificação do Reino Fungi baseada em dados genéticos e moleculares [adaptado de (65)].....	34
Figura 1. 9 Exemplos de metabolitos secundários fúngicos aplicados em tratamento clínico: (r) penicilina G; (s) ciclosporina A; (t) lovastatina [adaptado de (66)].....	36
Figura 1. 10 Apresentação microscópica de <i>C. albicans</i> (40X) [adaptado de (73)]	38
Figura 1. 11 Apresentação microscópica de <i>C. neoformans</i> (10X) [adaptado de (73)].....	39
Figura 1. 12 Apresentação microscópica de <i>S. cerevisiae</i> (10X) [adaptado de (73)]	40
Figura 2. 1 Representação do padrão de inoculação de acordo com o método Kirby-Bauer [adaptado de (90)].....	60
Figura 2. 2 Representação esquemática da placa de Petri após a aplicação dos discos [adaptado de (88)].....	60

Índice de tabelas

Tabela 1. 1 Exemplo de algumas enzimas fúngicas utilizadas na hidrólise de polissacarídeos ...	35
Tabela 1. 2 Alguns mecanismos promotores de virulência mais comuns [adaptado de (64)]	41
Tabela 1. 3 Exemplos de agentes etiológicos causadores de micoses [adaptado de (63)]	43
Tabela 1. 4 Resumo de alguns agentes antifúngicos inovadores e em avaliação clínica [adaptado de (87)]	47
Tabela 3. 1 Valores dos diâmetros médios e os correspondentes desvios-padrão (mm), dos halos de inibição do crescimento das leveduras resultantes da aplicação dos compostos sintetizados e de controlo. (-): ausência de halo; fluconazole (Flu); anfotericina B (Anf.B); nistatina (Nist) (Compostos em estudo [5 mg/ml (100 µg)]	62

Abreviaturas

5-FC - 5-fluorocitosina

5-FU - 5-fluorouracilo

Als3 - Proteína semelhante à aglutinina 3

Anf.B – Anfotericina B

BIM(s) – Bisindolilmetano(s)

DMSO – Dimetilsulfóxido

Flu – Fluconazol

GPI-CWP - Proteínas da parede celular modificadas por cadeias de glicosilfosfatidilinositol

HDA - Hetero Diels-Alder

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HOMO - Orbital molecular de mais alta energia ocupada

Hwp1 - Proteína da parede hifal 1

LUMO - Orbital molecular de mais baixa energia desocupada

MCF-7 – Células do adenocarcinoma da mama

NCIeH460 – Células do carcinoma do pulmão

Nist – Nistatina

Pir-CWP - Proteínas da parede celular com repetições internas

PMA - Acetato miristato de forbol

PMX – Resiniferatoxina

OVCAR-3 – Células do carcinoma do ovário

SNC - Sistema nervoso central

TLC – Cromatografia em camada fina

1. Introdução

1.1. Relevância clínica dos compostos indólicos

1.1.1. Indoles

Na natureza, existe diversos de compostos que apresentam atividade biológica promissora na área da química medicinal.^(1,2) Dentro dos compostos heterocíclicos, moléculas em anel que apresentam um ou mais heteroátomos, apresenta-se o indole (Figura 1.1), no qual consta uma estrutura bicíclica aromática, onde um anel de benzeno está associado a um anel pirrólico.^(3,4)

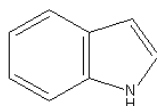


Figura 1. 1 Estrutura do indole

A sua frequência na natureza é bastante notável, visto que é constituinte de várias moléculas fisiológicas (Figura 1.2). O triptofano é um aminoácido essencial que, ao ser metabolizado, origina triptamina (a). O neurotransmissor serotonina é precursor da hormona reguladora do ciclo circadiano, a melatonina (b). A bufotenina (c) e a psilocibina (d) são substâncias alucinogénias presentes em determinadas espécies de sapos e cogumelos.^(4,5)

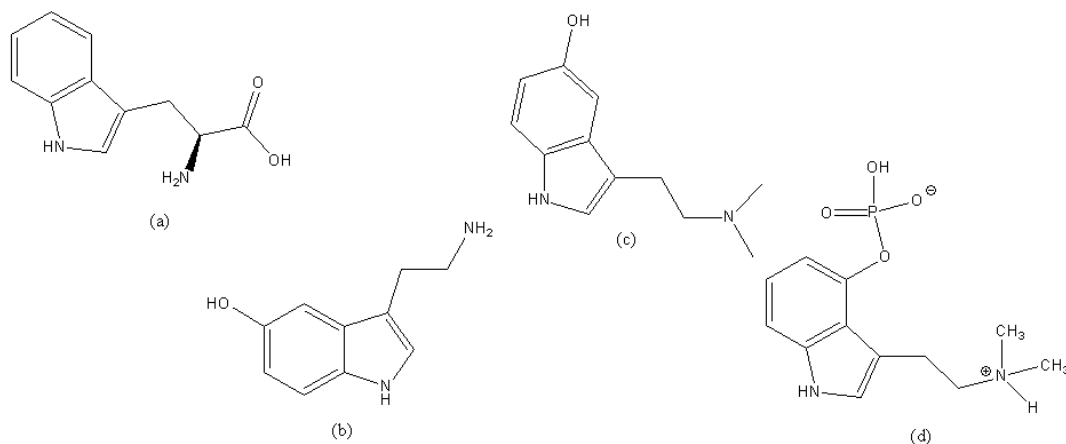


Figura 1. 2 Diferentes derivados indólicos existentes na natureza: (a) triptofano; (b) serotonina; (c) bufotenina; (d) psilocibina

Quando associada a diferentes grupos funcionais, gera-se uma variedade de moléculas com diferentes aplicações terapêuticas (Figura 1.3), podendo exibir atividade antineoplásica [p. ex., vimblastina (e)]; antirretroviral [p. ex., delavirdina (f)]; antipsicótica [p. ex., oxipertina (g)]; antidepressiva [p. ex., amedalina (h)]; antiasmática [p. ex., zafirlucaste (i)]; anti-inflamatória [p. ex., indometacina (j)]; antihipertensiva [p. ex., perindopril (k)] e ao nível da disfunção sexual [p. ex., tadalafil (l)].^(1,3,4,5,6,7,8)

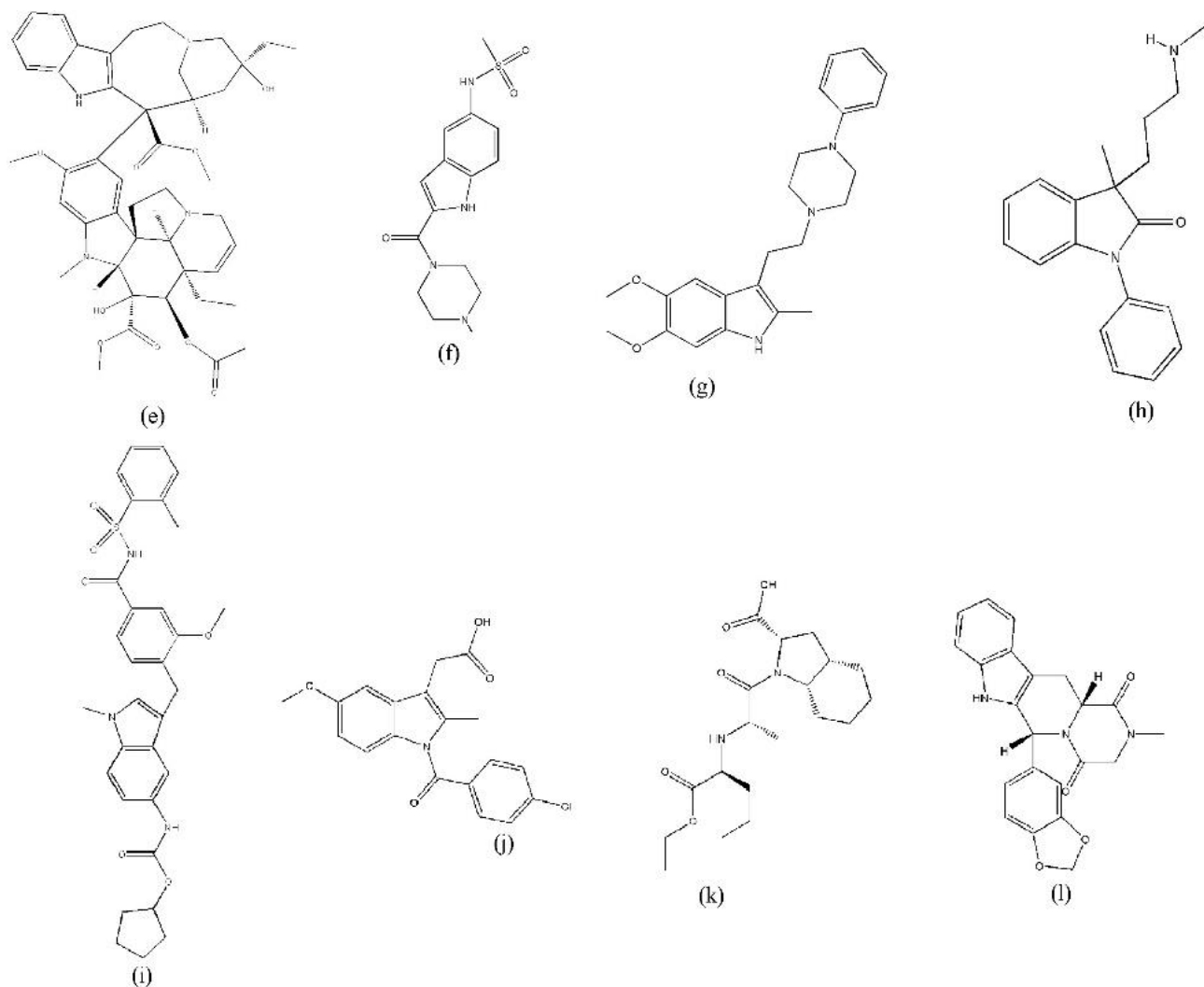


Figura 1. 3 Diferentes fármacos comercializados que contêm indole na sua composição:
 (e) vimblastina; (f) delavirdina; (g) oxipertina; (h) amedalina; (i) zafirlucaste; (j)
 indometacina; (k) perindopril; (l) tadalafil

1.1.2. Bisindolilmetanos

O bisindolilmetano (BIM) (Figura 1.4), também conhecido como 3,3-diindolilmetano, é um derivado indólico, procedente da metabolização de indole-3-carbinol, presente em vegetais crucíferos (brócolo, couve-de-flor e de-bruxelas), cujo interesse tem vindo a aumentar nos últimos anos, não só pela sua vasta aplicabilidade em várias áreas da ciência em geral, mas também quanto à acessibilidade de obtenção via síntese, devido à sua simetria estrutural.^(9,10,11)

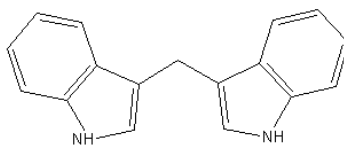


Figura 1. 4 Estrutura química do BIM

Os BIMs manifestam-se extensamente na natureza e sob várias formas. O streptindole (m) é um metabolito genotóxico derivado das bactérias *Streptococcus faecium* e *Bacillus subtilis*, presentes no intestino humano.^(8,10) O vibrindole A (n) é proveniente da associação entre metabolitos da bactéria marinha *Vibrio parahaemolyticus* e substâncias presentes no muco tóxico libertado pelo peixe-cofre-amarelo.^(10,12) A trisindolina (o) encontra-se em bactérias do género *Vibrio*, presentes em esponjas marinhas da espécie *Hyrtios altum* e na planta *Isatis costata*. O arsindole A (p) e B (q) estão associadas ao género bacteriano marinho *Aeromonas* (Figura 1.5).⁽⁹⁾

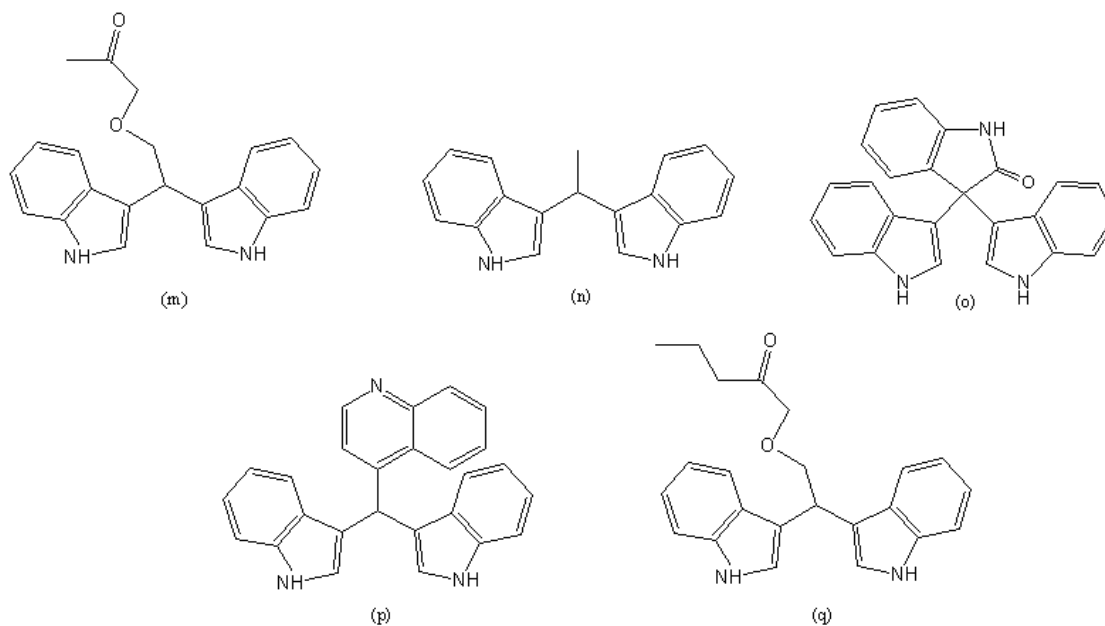


Figura 1. 5 Diferentes derivados BIM existentes na natureza: (m) streptindole; (n) vibrindole A; (o) trisindolina; (p) arsindole A; (q) arsindole B

O seu papel no contexto científico é bastante transversal. Os compostos Hamacantina A e B apresentam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.^(8,11) Alguns BIMs apresentam atividade anticancerígena promissiva, exibindo capacidade anti proliferativa, por vários mecanismos, dispondo um efeito mais promissor em linhas celulares de linfomas, leucemias, cancro mamários e da próstata.^(9,11,12) A soritina A apresentou atividade em crises inflamatórias, induzidas pelo acetato miristato de forbol (PMA) e pela resiniferatoxina (PMX).⁽¹⁰⁾ Quando combinados com fluconazol, BIMs associados a grupos substituintes fenólicos estimulam a produção de espécies reativas de oxigénio que causam a inibição do crescimento de estirpes resistentes de *Candida albicans*.⁽¹⁴⁾ O intitulado *Bioresponse-3,3'-Diindolylmethane* (BR-DIM), confere proteção celular face a agentes oxidantes via regulação positiva e fosforilação da proteína supressora de tumores BRCA1 e do fator de transcrição antioxidante NRF2.⁽¹⁵⁾ Revelou ação antiparasitária, suprimindo a atividade de *Leishmania donovani*.^(10,13,16) Além disso, verifica-se que os BIMs possuem um papel importante como auxiliar de diagnóstico, atuando como agentes de contraste, corantes e sensores colorimétricos.^(12,17)

1.2. Estratégias de síntese de compostos indólicos

1.2.1. Promotores de síntese

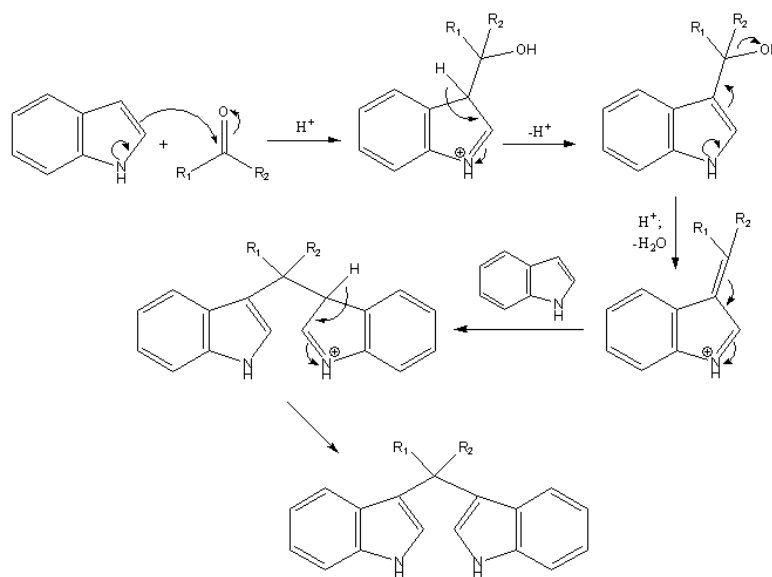
A síntese de BIMs baseia-se principalmente na reação entre indole com um derivado carbonílico, na presença de um agente catalítico.^(9,10,11,14,17,18,19,20) Vários tipos de promotores podem estar envolvidos no processo, entre eles os ácidos de Lewis (p.e brometo de cobre (II)) e protônicos (p.e cloreto de amónio), ácidos sólidos (tais como nanocatalizadores e zeólitos), líquidos iónicos (bissulfato de morfolínio), iodo, heteropoliácidos (p.e. ácido difosfooctadecatúngstico), resinas (amberlyst ou de troca iónica), surfactantes (p.e. dodecil sulfato de sódio), solventes eutéticos (p.e.mistura de cloreto de colina com glicerol), biocatalizadores (p.e.α-quimotripsina), catalisadores baseados em metais de transição (p.e. irídio), sumos naturais de frutos (p.e.sumo de limão) e outras moléculas orgânicas (p.e. cloreto cianúrico).^(9-12,14,16-29) As reações podem-se desenvolver recorrendo tanto a solventes aquosos ou orgânicos e, em certos casos, até mesmo na ausência destes. Adicionalmente, quando necessário, nomeadamente para acelerar o processo, aplica-se radiação microondas e de luz visível, ultrassons e química de fluxo.^(20,29)

1.2.2. Estratégias iniciais

A estratégia de síntese dos BIMs tem evoluído ao longo do tempo, uma vez que mesmo associado a um elevado rendimento e seletividade, o produto final nem sempre apresentava viabilidade na prática clínica. Inicialmente, Fischer, em 1886, obteve BIMs a partir de fenilhidrazina substituídas em reações com aldeídos ou cetonas, em meio ácido. Posteriormente, os processos de síntese destes compostos foram baseados na reação entre formaldeído e diferentes indoles, num meio aquoso-alcoólico.^(17,30) No ano 1963, Kamal e Clemen obtiveram BIMs mediante a condensação de variados aldeídos com indoles, alternando o pH em ambiente aquoso.⁽¹⁷⁾

1.2.3. Reação de Friedel-Crafts

A reação de alquilação Friedel-Crafts (Esquema 1.1) tornou-se o método mais comum de geração de BIMs, em que uma molécula inicial de indole reage com uma de aldeído ou cetona, na presença de um ácido de Lewis ou prótico, originando o sal azafulvênio, decorrendo posteriormente uma adição adicional de uma outra molécula de indole e consequente rearomatização.^(10,17,18)



$R_1 = R_2 =$ Grupo arilo ou alquilo, H^+ e Het

Esquema 1. 1 Reação de alquilação Friedel-Crafts entre indole e aldeído ou cetona na síntese de BIMs

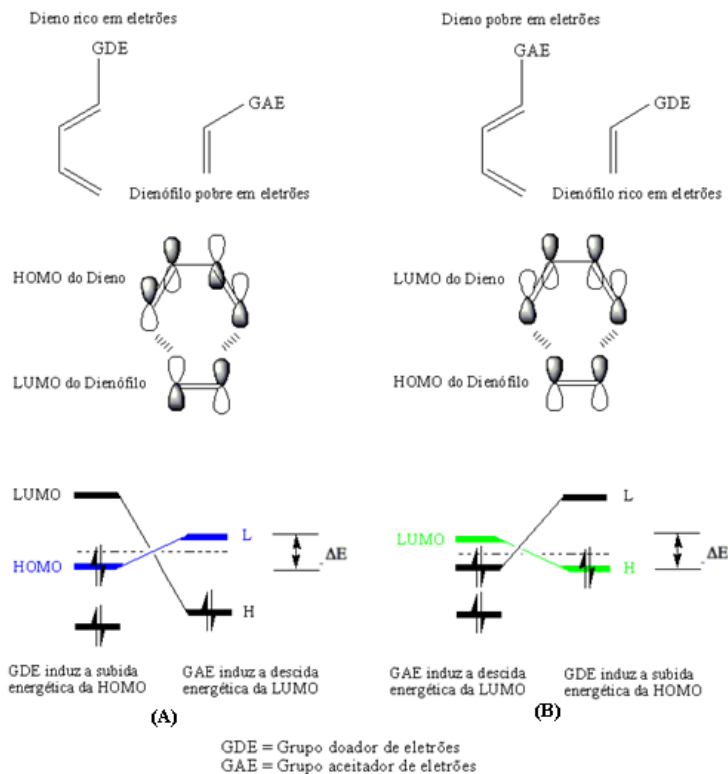
1.2.4. Reação de hetero Diels-Alder

Recentemente, outra alternativa promissora e versátil envolve uma dupla reação consecutiva de ciclo-adição hetero Diels-Alder (HDA) entre nitroso- e azoalcenos.^(12,17,19,25,31,32)

Estas reações de HDA correspondem a uma reação concertada, $[4\pi+2\pi]$ suprafacial, entre um dieno conjugado e um dienófilo, os quais incluem um ou mais heteroátomos, regularmente de azoto ou oxigénio.⁽³²⁻³⁷⁾

A reação pode ser interpretada com base na Teoria das Orbitais Moleculares de Fronteira, fundamentando que a partir da sobreposição da respectiva HOMO (orbital molecular de mais alta energia ocupada) e LUMO (orbital molecular de mais baixa energia desocupada), os elétrons envolvidos nas ligações π , presentes no dieno e dienófilo, originam duas ligações σ e uma ligação π , resultando num ciclo-produto, correspondente a um ciclohexeno substituído.^(32,33,35,36)

Caracteriza-se a HDA como normal ou inversa, dependente da energia relativa das orbitais moleculares de fronteira, de ambas as moléculas.⁽³³⁻³⁷⁾ Em circunstâncias normais, a reação é regida pela HOMO_{dieno} e LUMO_{dienófilo} e, em contrapartida, na condição inversa, ocorre a interação entre LUMO_{dieno} e HOMO_{dienófilo} (Esquema 1.2).⁽³³⁻³⁷⁾

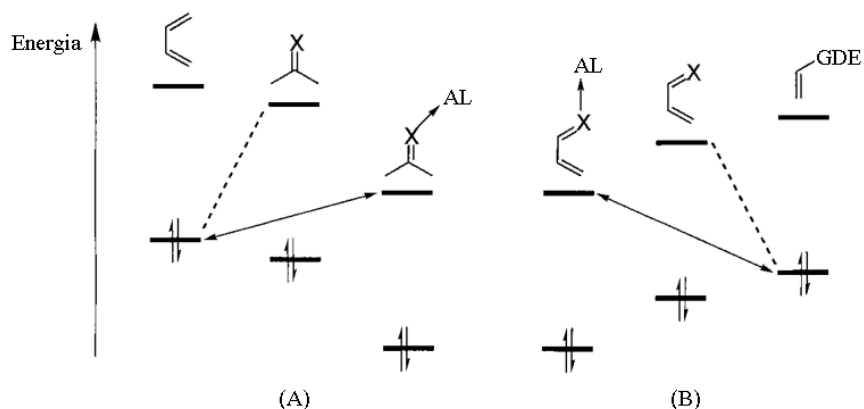


Esquema 1.2 As duas classes de reação de cicloadição HDA: (A) normal; (B) inversa

Estas reações poderão ser promovidas pela ação catalítica de um ácido de Lewis presente no meio, uma vez que coordena com o dienófilo em condições normais ou com o dieno na situação de reação inversa, induzindo uma redução energética das respectivas LUMO e assim, segundo a Teoria das Orbitais Moleculares de Fronteira, promove-se uma sobreposição de

orbitais mais forte devido ao menor diferencial energético entre as duas orbitais (Esquema 1.3).⁽³⁵⁾

Geralmente, para ambas as reações, uma seletividade endo é observada nas estruturas no estado de transição e no produto final, suportado por dados associados a energia de ativação mais baixos e do efeito estereo. Esta regra foi justificada pela primeira vez por Woodward e Hoffman, em que o estereoisómero principal, resultante das reações Diels-Alder, é determinado pela acumulação máxima de ligações duplas, estabelecidas pela interação de orbitais secundárias, responsáveis pela estabilização das interações eletrônicas, entre orbitais atômicas, em que não envolvam ligações σ .^(33,34,36,37-39)



Esquema 1. 3 Ação do ácido de Lewis sobre as orbitais atômicas envolvidas na reação cicloadição HDA: (A) normal; (B) inversa

Uma das metodologias utilizadas na síntese BIMs, engloba a interação entre indole e azo ou nitrosoalcenos.^(19,25,31,40-46)

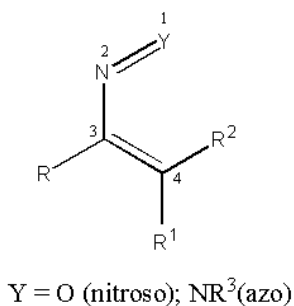
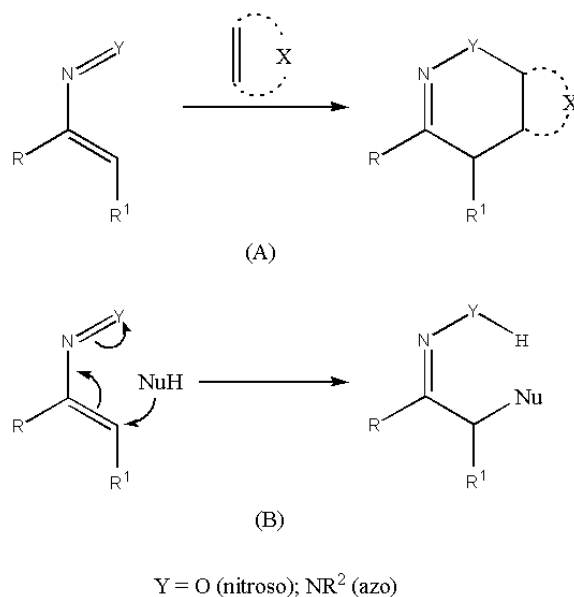


Figura 1. 6 Estrutura e numeração de azo- e nitrosoalceno

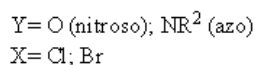
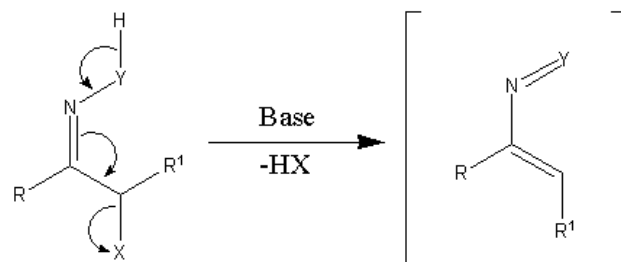
Estas espécies têm alcançado interesse nas últimas décadas, nomeadamente à elevada reatividade que apresentam, que devido a uma existente conjugação entre o grupo azo ou nitroso e a ligações dupla C=C, gera um elevado carácter eletrofílico, centrado no carbono na posição 4, tornando-o suscetível a um ataque nucleofílico. Esta característica permite que tenham um papel comum como heterodienos eletrodeficientes, em reações de HDA ou aceptadores do tipo Michael em reações de adição-1,4 conjugadas (Esquema 1.4).^(31,40-48)



Esquema 1. 4 As típicas reações em que os azo- e nitrosoalcenos encontram-se envolvidos: (A) HDA; (B) adição-1,4 conjugada

A formação e interceção destas espécies, devido à sua natureza instável, quando não possuem um substituinte na posição 4, realiza-se normalmente *in situ*. No entanto, em certas condições, dependendo da natureza dos substituintes nas posições 1,3 e 4, as moléculas são estáveis o suficiente para serem extraídas e purificadas, inclusive por cromatografia em coluna ou de flash. Em solução, a existência destes compostos poderá se detetável devido a uma coloração azul-esverdeada ou amarelo-avermelhada, para nitroso e azoalcenos, respetivamente.^(31,41-43,47,49,50)

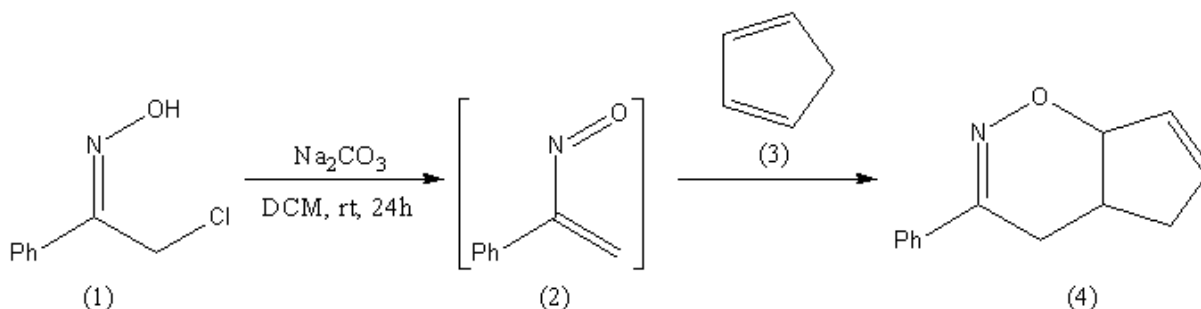
O método mais recorrente, aplicado na síntese destes compostos, parte da 1,4-desidrohalogenação de α -halooximas e α -halo-hidrazonas, mediada pela presença de uma base (Esquema 1.5).^(40-44,46-51)



Esquema 1.5 Geração de Azo- e Nitroso-alcenos via desidrohalogenação

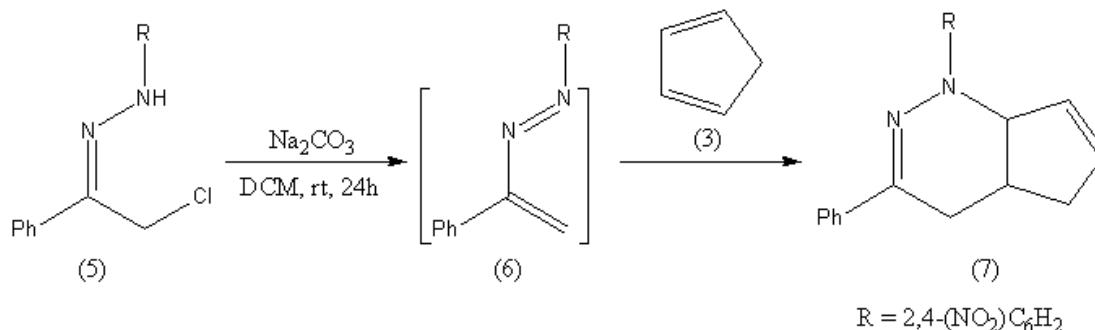
De todas as classes de reações em que estas duas espécies participam, a de cicloadição $[4\pi+2\pi]$ é a que tem maior relevo. Nestas reações, azo- e nitrosoalceno geram derivados de 1,4,5,6-tetrahidropiridazina e 5,6-dihidro-4H-1,2-oxazina, respetivamente, que podem servir como intermediários de grande valor, na síntese de outros compostos cíclicos ou acíclicos com potencial atividade biológica ou de interesse comercial e farmacológico.^(46,50,51)

O fundamento teórico por de trás destas reações, bem como informação referente às propriedades físicas, estrutura e reatividade dos alcenos e de produtos resultantes, já são conhecidos desde o início do século XX, porém, Gilchrist e a sua equipa, em 1975, estabeleceram um marco progressivo, com demonstração da reação entre nitrosoalcenos (2) (preparados *in situ*, partindo da α -halooxima (1), por ação intermediária do agente básico, neste caso carbonato de sódio anidro e diclorometano como solvente, sob agitação durante 24 horas) e ciclopentadieno (3), resultando num derivado de 1,2-oxazina (4), com um elevado rendimento (cerca de 90%) e seletividade (Esquema 1.6).^(44,50,52,53)



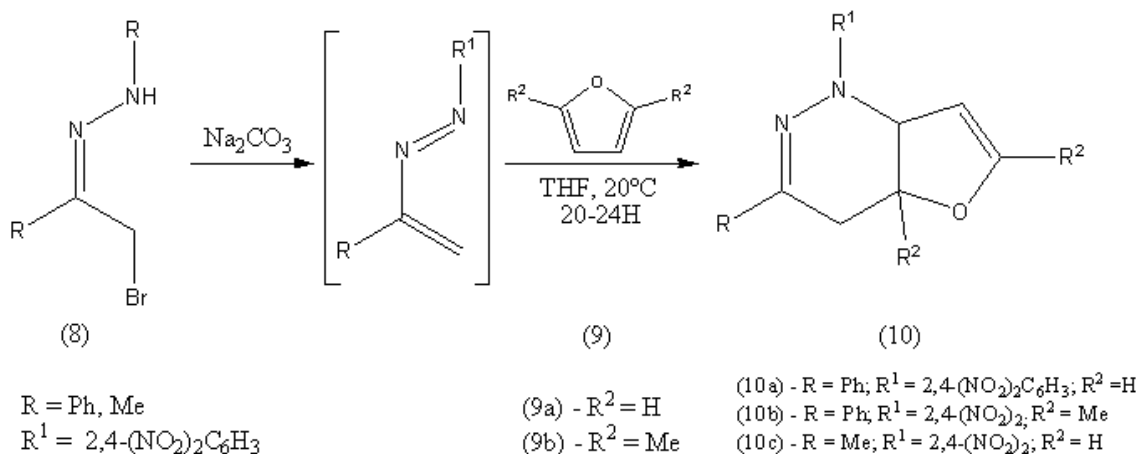
Esquema 1.6 Preparação de derivados de 1,2-oxazina via HDA

Também se verificou, num estudo realizado pela mesma equipa, a execução da mesma reação, partindo do azoalceno (6) (que por sua vez, foi formado *in situ* a partir de α -halohidrazona (5), nas mesmas condições previamente descritas), no qual resultou na formação dum derivado de piridazina (7), com um rendimento também notável (acerca de 96%) (Esquema 1.7).⁽⁴⁴⁾



Esquema 1. 7 Preparação de derivados de piridazina HDA

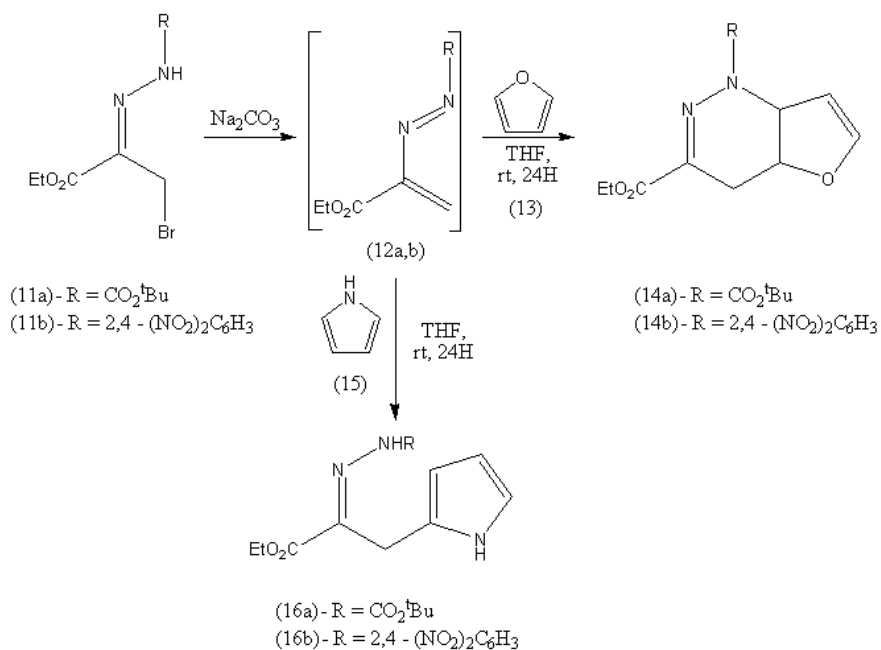
No âmbito da reação de HDA, Gilchrist e a sua equipa basearam-se na interação entre azoalcenos (8) e furanos ou 2,5-dimetil furanos (9a e b), cujos produtos cíclicos finais (10a, b e c) foram obtidos com rendimento moderado a bom (entre 22 a 89%) (Esquema 1.8).⁽⁴⁴⁾



Esquema 1. 8 Reações HDA, entre azoalcenos e furano e 2,5-dimetilfurano

Subsequentes estudos detalham a síntese de novas tetrahidropiridazinas (14a e b), via reação de HDA, recorrendo a azoalcenos (12a e b) substituídos na posição C-3, com o grupo etoxicarbonilo. A síntese destes heterociclos também se desenrolou *in situ*, pela desidrogenação de α -halooximas (11a e b), que na presença de furano (13), originam

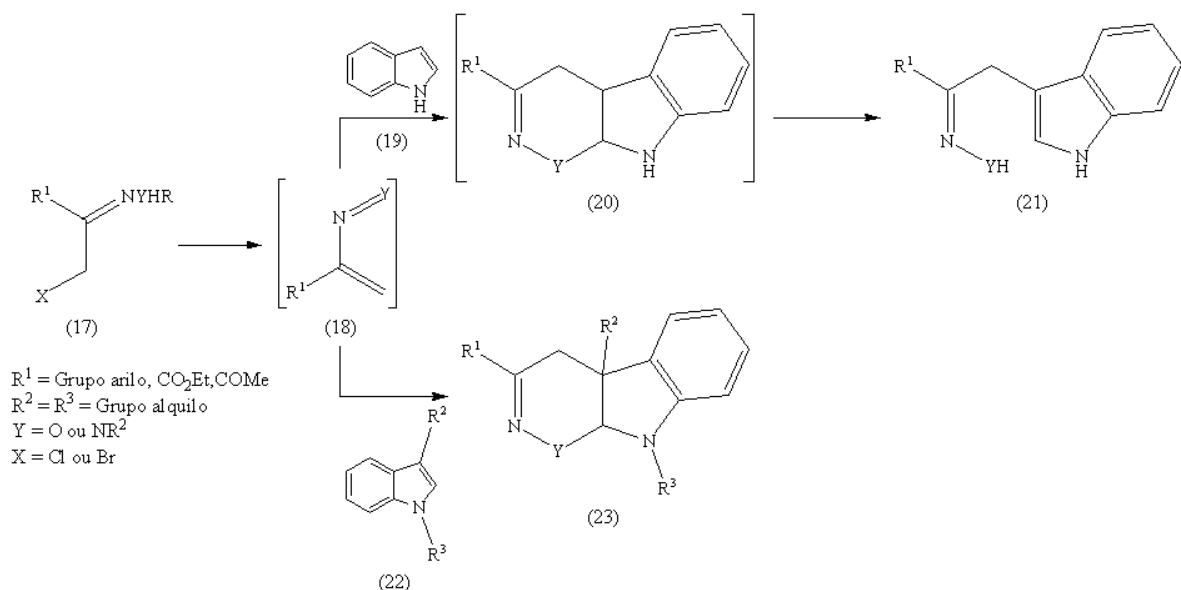
cicloadutos com uma rendimento entre os 73 e 100%.⁽⁵⁴⁾ Na reação de azoalcenos com pirrole (15), resultando em estruturas equivalentes, mas neste caso de cadeia aberta (16a e b), o rendimento consequente traduziu-se 75% para (a) e 92% para (b) (Esquema 1.9).⁽⁵⁴⁾



Esquema 1. 9 Reações de HDA de tetrahidropiridazinas e cicloadutos com cadeia aberta

A obtenção de cicloadutos quando as reações de HDA são realizadas na presença de furanos contrastam com aquelas realizadas com pirrole onde são isoladas oximas ou hidrazonas de cadeia aberta. A explicação residirá no ganho energético superior da rearomatização dos núcleos pirrólicos quando comparados com os do furanos.^(32,41)

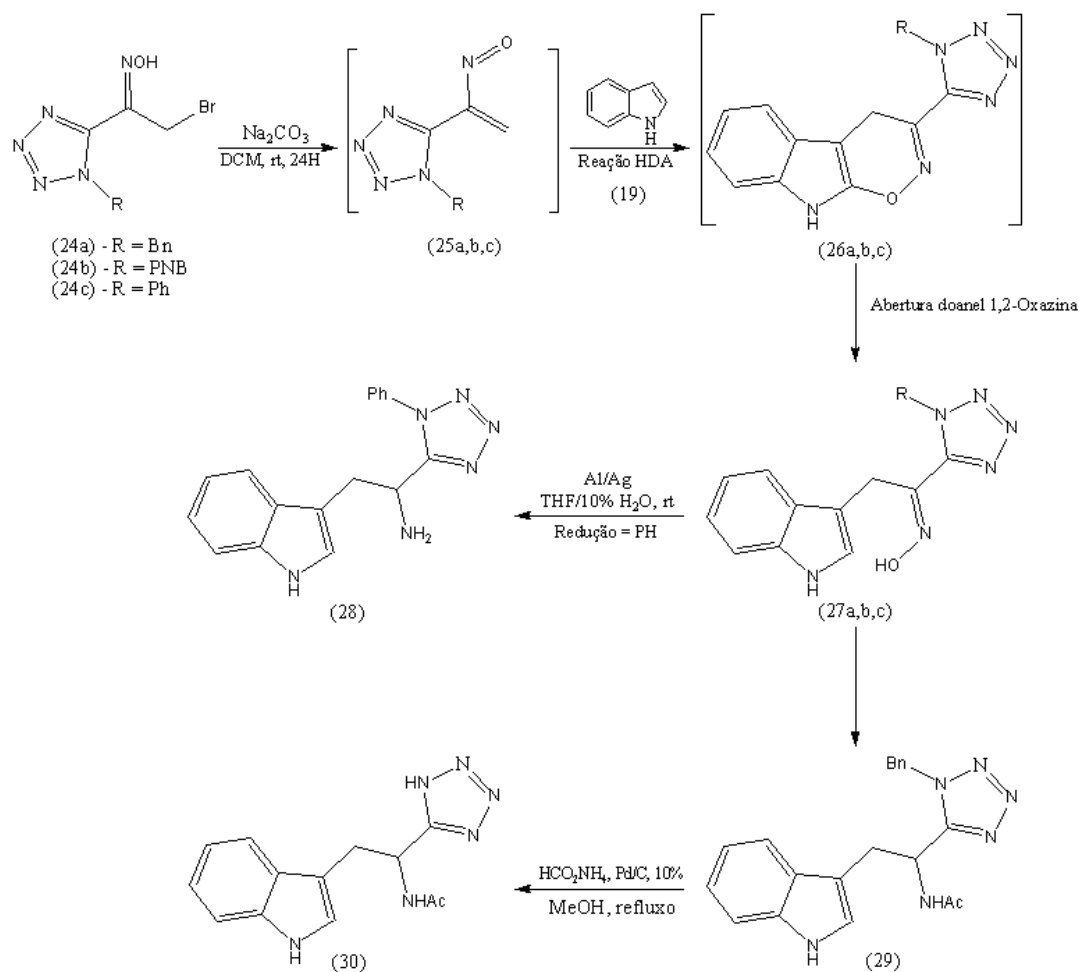
Com base nestes trabalhos, investigações posteriores recorreram a azo- e nitrosoalcenos (18), igualmente substituídos no C-3, na realização de reação HDA, conjuntamente com indole (19), produzindo (E)-Oximas (21). Paralelamente, a interação entre alcenos intermediários com 3-alkilindoles (22) conduziu à formação a cicloadutos (23) (Esquema 1.10).⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾



Esquema 1.10 Reação de cicloadição HDA entre azo- e nitrosoalcenos C-3 e índoles

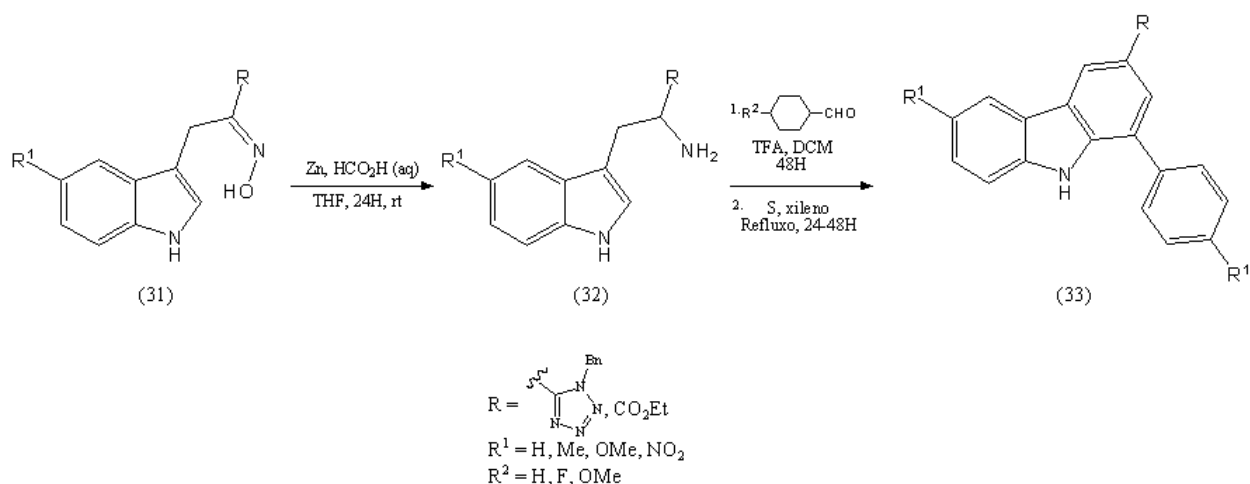
De realçar, novamente, a obtenção de adutos de cadeia aberta resultantes da rearomatização do núcleo indólico, de um modo em todo similar ao que se passa com o pirrole. Quando a possibilidade de evolução do carbono sp^3 a sp^2 está bloqueado com a substituição do átomo de H por grupos alquilo em C-3 do indole, cicloadutos são obtidos como produto final.⁽⁴¹⁾

A reação entre nitroso-alcenos e indoles tornou-se a base para o desenvolvimento de promissores análogos do triptofano, por Pinho e Melo *et al.* O foco estava na interação dos 3-tetrazolil-nitrosoalcenos (25a, b e c), gerados *in situ*, com o indole, levando à formação de oximas de cadeia aberta (27a, b e c), devido à abertura do anel e rearomatização associada à molécula de indole, inicialmente formada a partir dos cicloaductos HDA. Este método permitiu que obtivessem produtos maioritários dos análogos pretendidos (28 e 30), cujo respetivos rendimentos rondaram 66 e 78% (Esquema 1.11).⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾



Esquema 1. 11 Síntese de análogos do triptofano derivados de nitroviniltetrazóis

Esta abordagem sintética utilizada na síntese dos análogos de triptofano fundamentou a base para o desenvolvimento de novos derivados β -carbólicos (33) (Esquema 1.12), dotados de atividade anticancerígena, promissora contra adenocarcinoma da mama (MCF-7), carcinoma do pulmão (NCIeH460) e carcinoma do ovário (OVCAR-3).⁽⁵⁹⁾



Esquema 1.12 Sequência sintética para obtenção de 3-tetrazolil-β-carbolinas

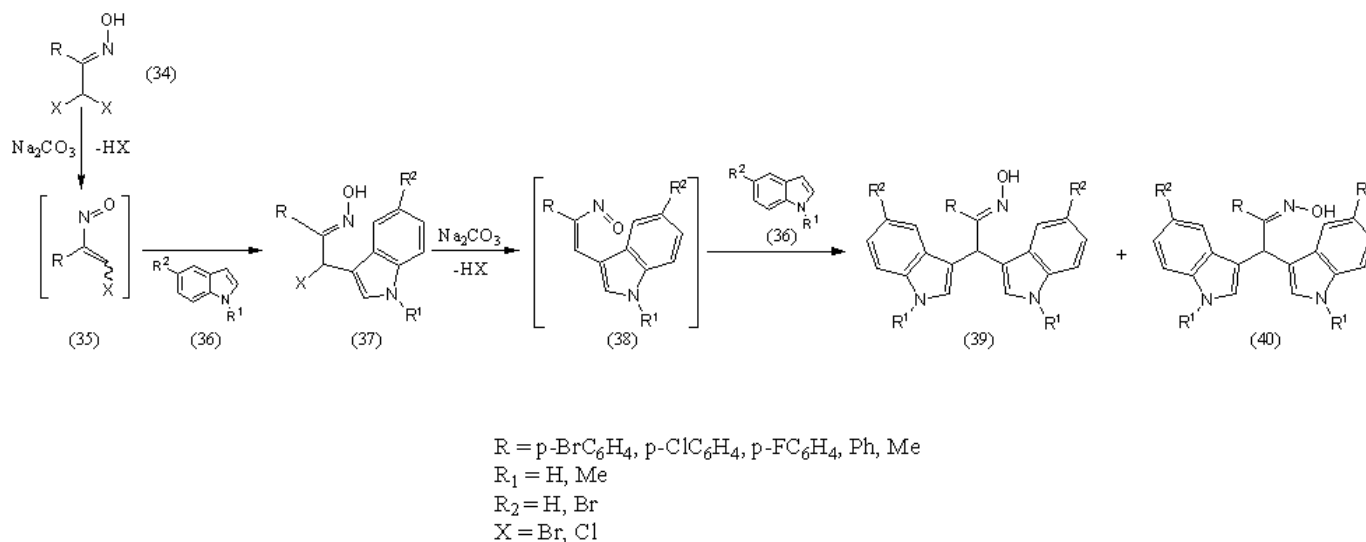
1.2.5. Síntese de bisindolilmetanos via reação de hetero Diels-Alder

Uma das mais recentes estratégias para a obtenção de BIMs e os seus respetivos derivados, recorrendo a reações bis-hetero Diels-Alder, foi demonstrado pelo trabalho experimental de Grosso et al (2015), produzindo derivados 1-hidroxiiminometil com potencial atividade anticancerígena contra vários tipos de células tumorais.⁽¹²⁾

Com base no prévio trabalho que realizaram, por reação bis-hetero-Diels-Alder de azo- e nitrosoalcenos conjugados com pirrole, os autores prepararam α,α'-dihalogeno oximas (34) a partir de cetonas, que na presença de uma base, neste caso carbonato de sódio, gerou *in situ* o correspondente nitrosoalceno reactivo (35).⁽⁹⁾⁽⁴¹⁾ Os nitrosoalcenos são depois intercetados por uma molécula de indole (36), formando o intermediário tetrahidroxazina (37), que sofre abertura do anel, impulsionada pela rearomatização associada a um maior ganho energético e seguidamente, decorre a dehidrohalogenação do intermediário que resulta na formação de nitrosoalcenos (38) que reagem com a segunda molécula de indole, assim resultando nos BIMs desejados. Com base nos resultados, as oximas empregues nestas reações poderiam apresentar o grupo alquilo ou arilo, que conseqüentemente originam oximas com a estereoquímica (Z) (39) e (E) (40), respetivamente, quando reagem com o indole (Esquema 1.13).⁽⁹⁾

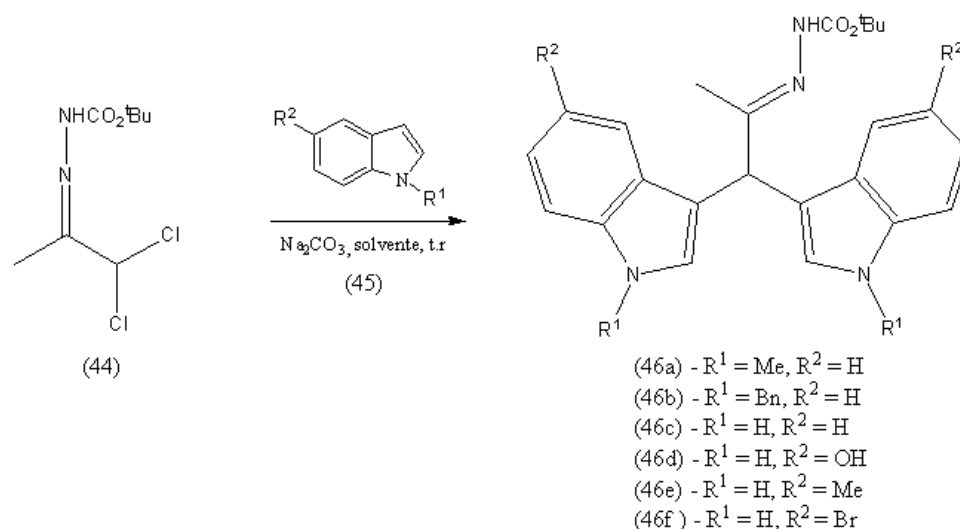
Água, diclorometano e/ou uma mistura de ambos serviram como solventes. Para além de acelerar todo o processo e promoverem uma maior seletividade e rendimento final, a utilização

de diclorometano como co-solvente revelaria uma melhoria em termos do rendimento e redução significativa do período da reação, comparado só com a utilização de somente diclorometano. Conclui-se que a eficiência da reação é aprimorada com a mistura destes dois solventes, inclusive quanto maior o grau de eletrofilicidade dos grupos substituintes arilo halogenados, presentes nos nitrosoalcenos, tal como seria esperado para uma reação de Diels-Alder inversa.⁽⁹⁾



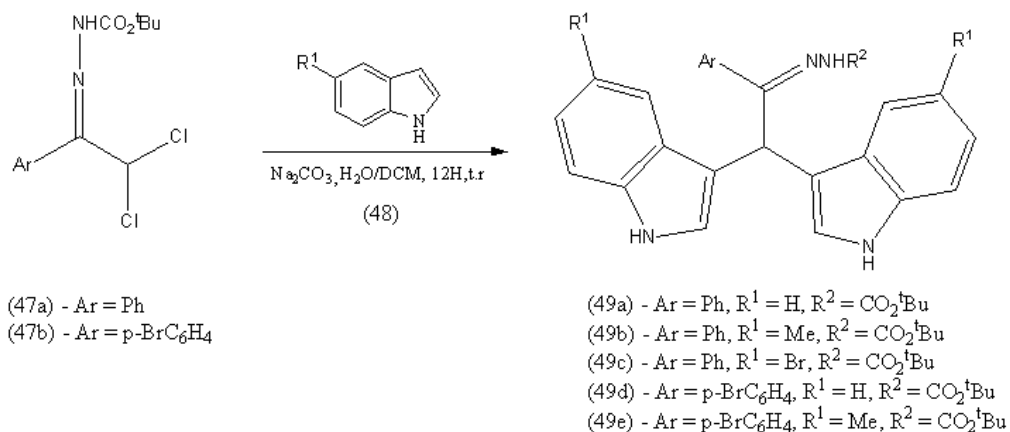
Esquema 1. 13 Estratégia geral de síntese de BIMs via reações bis-hetero Diels-Alder

Posteriores estudos, também efetuados pelos mesmos autores, focaram-se na síntese de 1-hidroxi-iminometil-bisindolilmetanos anteriormente desconhecidos, via reação bis-hetero-Diels-Alder de azoalcenos com indoles. Estes derivados resultaram da reação entre a oxima 2,2-dibromo-1-(4-bromofenil)etanona (41) e indoles (42) substituídos na posição C5, utilizando os mesmos solventes do trabalho anterior (Esquema 1.14). As reações demonstraram ser regio e estereoseletivas, onde E-oximas (43a, b, c e d) consistiam nos únicos ou maioria dos produtos. A eficiência da reação segue o padrão das reações de Diels-Alder de procura eletrônica inversa em que os componentes 2π possuidores de grupos eletrodoadores (indoles) estão associados aos melhores rendimentos 5-hidroxi- (43b) e 5-metoxiindole (43d) (78%).⁽¹⁰⁾



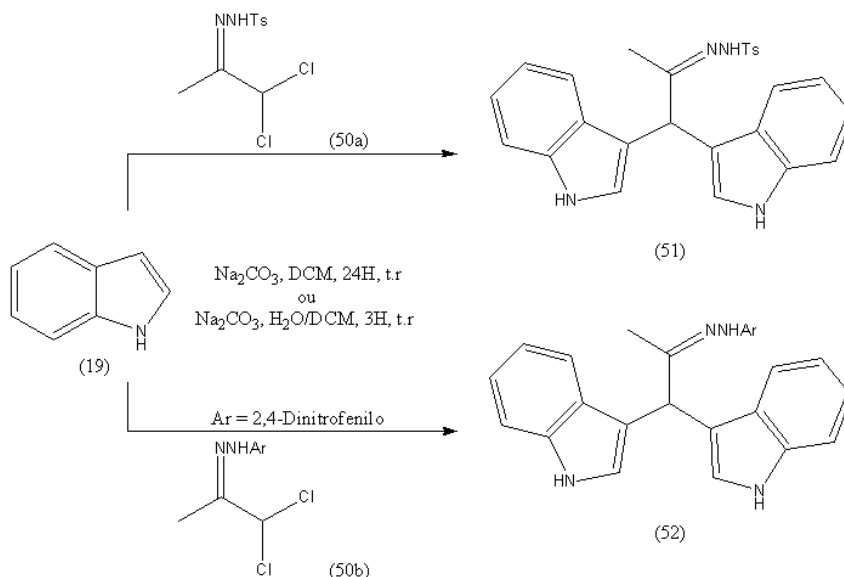
Esquema 1. 15 Estratégia de síntese de hidrazonas derivadas de diclorohidrazona via reações bis-hetero Diels-Alder

Este trabalho experimental também englobou o estudo da reação entre α,α' -dihalohidrazonas (47a e b) e indoles (48), observando-se a desidrohalogenação, induzida pela base (Esquema 1.16). Nas condições otimizadas previamente estabelecidas, recorrendo à mistura solvente água/diclorometano, os BIMs (49a-c) foram obtidos, mas com um rendimento baixo, de 7%, 11% e 29%, respectivamente, na presença de 5-metilindole, indole e 5-bromoindole. Empregando diclorohidrazona, obtiveram-se BIMs (49d e e) com um rendimento de 13% e 17%, na reação entre 5-metilindole e indole, respectivamente, como também hidrazina, mas com um rendimento bastante baixo, quando reage com indole.⁽¹⁰⁾



Esquema 1. 16 Estratégia de síntese de hidrazonas derivadas de α,α' -dihalohidrazonas via reações bis-hetero Diels-Alder

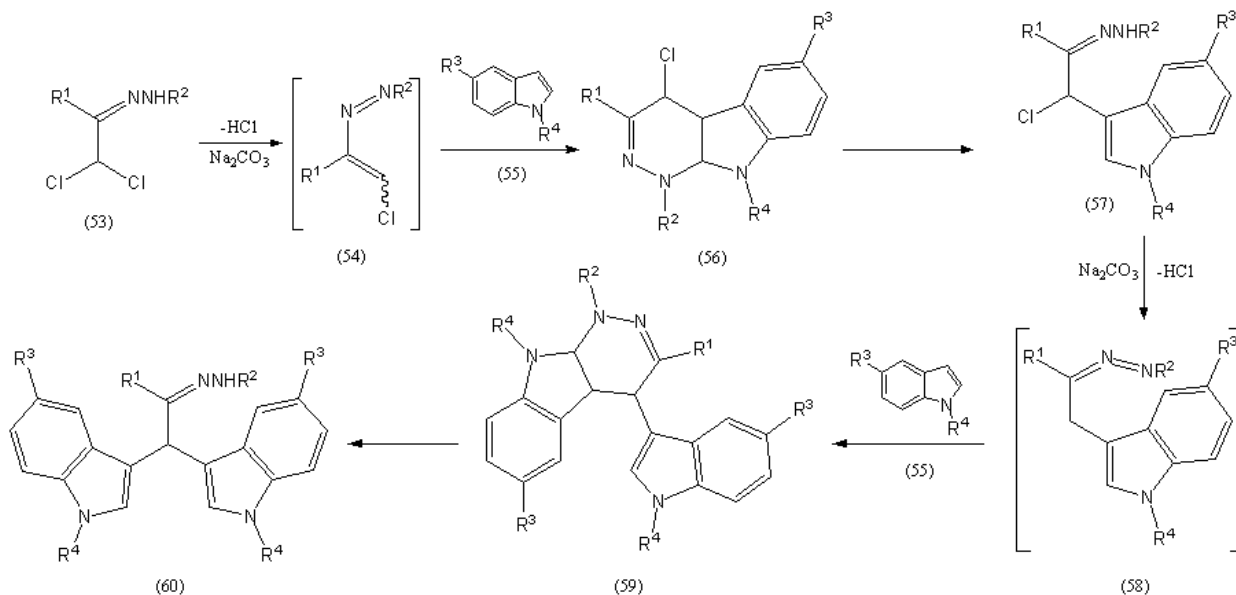
Uma vez que a hidrazona derivada de dicloroacetona resultou de uma reação otimizada, os autores prepararam um conjunto de hidrazonas, derivadas do mesmo composto cetônico, estabelecendo a reatividade associada às mesmas. Formaram BIMs a partir de azoalcenos com o grupo tosilo (51) e 2,4-dinitrofenilo (52) e indole, em água/diclorometano. A presença do grupo tosilo possibilitou a obtenção de BIMs com um rendimento de 41%, enquanto 2,4-dinitrofenilo viabilizou extensivamente a reação permitindo o isolamento do produto, com um rendimento mais elevado (87%) (Esquema 1.17). Os resultados permitiram concluir que os grupos substituintes existentes nas hidrazonas, em comparação com as oximas, assumem uma enorme relevância sobre a eficácia na reação, acompanhado com a necessidade de manter um balanço entre a eletrofilicidade e estabilidade do heterodieno azovinilo transiente. Assim a eficiência da reação, para produtos isolados, é mais elevado quando o grupo substituinte em causa é o 2,4-dinitrofenilo, seguido por t-butoxicarbonilo e assim mais baixa no caso do tosilo.⁽¹⁰⁾



Esquema 1. 17 Estratégia de síntese de hidrazonas via reações bis-hetero Diels-Alder a partir de azoalcenos que apresentam o grupo tosilo e 2,4-dinitrofenilo

Os autores estipularam então uma estratégia eficiente para a obtenção de BIMs, partindo da geração *in situ* de 4-cloroazoalcenos (54), a partir da correspondente α,α' -diclorohidrazona (53), que atuam como heterodienos quando interagem com a primeira molécula de indole (55). Após rearomatização o heterociclo (57), seguidamente, sofre dehidrohalogenação, gerando o respetivo azoalceno (58). Este interatua com uma segunda molécula de indole, originando o

intermediário tetrahidropiridazina (59), que novamente por rearomatização é sujeito a uma abertura do anel, acabando por originar os BIMs alvos (60) (Esquema 1.18).⁽¹⁰⁾



Esquema 1. 18 Estratégia de síntese de BIMs via reações bis-hetero Diels-Alder a partir de α, α' -diclorohidrazonas e indoles

1.3. Agentes antifúngicos

1.3.1. Fungos

Os fungos englobam um grupo de organismos variados, incluídos no Reino Fungi, que se distinguem de outros seres eucariotas pelo facto de possuírem um conjunto de características, determinadas pelo seu perfil genético, podendo salientar-se os seguintes: o comportamento nutricional, o estado vegetativo, a parede celular constituída maioritariamente por glucanos e quitina, a natureza uni ou multinucleada, os ciclos de vida diversificados, o tipo de reprodução sexuada ou assexuada, a presença de ergosterol na membrana plasmática, entre outros.^(62,63)

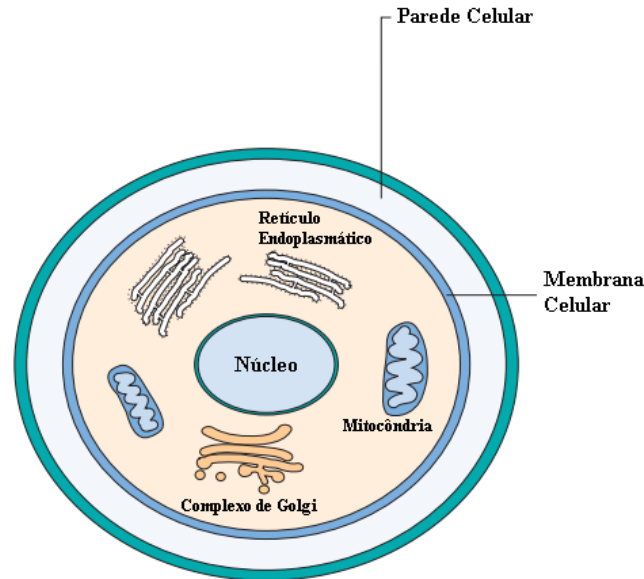


Figura 1.7 Representação esquemática da célula fúngica [adaptado de (64)]

Os membros do Reino Fungi podem assumir uma forma unicelular (leveduras) (Figura 1.7) ou multicelular (fungos filamentosos). Algumas espécies podem existir em ambas as formas, dependendo das condições ambientais, sendo designadas dimórficas. ⁽⁶²⁻⁶⁵⁾

Inicialmente, os fungos eram classificados de acordo as estruturas morfológicas, envolvidas na reprodução, resultando numa divisão em 4 filis: Chytridiomycota, Zygomycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes. ⁽⁶⁵⁾

Posteriormente, os estudos baseados na similaridade genética, permitiram organizar o reino Fungi em 8 filis: Cryptomycota (=Rozellomycota), Microsporidia, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Zoopagomycota, Mucormycota, Ascomycota e Basidiomycota (Figura 1.8). Os filis Ascomycota e Basidiomycota estão incluídos no sub-reino Dikarya. Os fungos anteriormente classificados no filo Zygomycota, foram redistribuídos entre os filis Mucormycota e Zoopagomycota. A maioria dos membros de significativa importância clínica, anteriormente incluídos no filo Zygomycota, estão contidos na ordem Mucorales do filo Mucormycota. O filo Ascomycota foi dividido em três subfilis (*Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina*, *Pezizomycotina*). O subfilo *Taphrinomycotina* contém um género de fungo clinicamente importante, *Pneumocystis*. No que diz respeito ao subfilo *Saccharomycotina*, os membros da ordem *Saccharomycetales* são os que revelam maior impacto clínico, abrangendo a maioria das leveduras ascomicetas patogénicas (*C. albicans*, *C. auris*). Os restantes

representantes ascomicetas, clinicamente importantes, são classificados no subfilo *Pezizomycotina*. O filo Basidiomycota foi redistribuído em três subfilos: *Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* e *Agaricomycotina*. A levedura *Cryptococcus neoformans* está incluída na classe *Tremellomycetes* do subfilo *Agaricomycotina*.⁽⁶⁵⁾

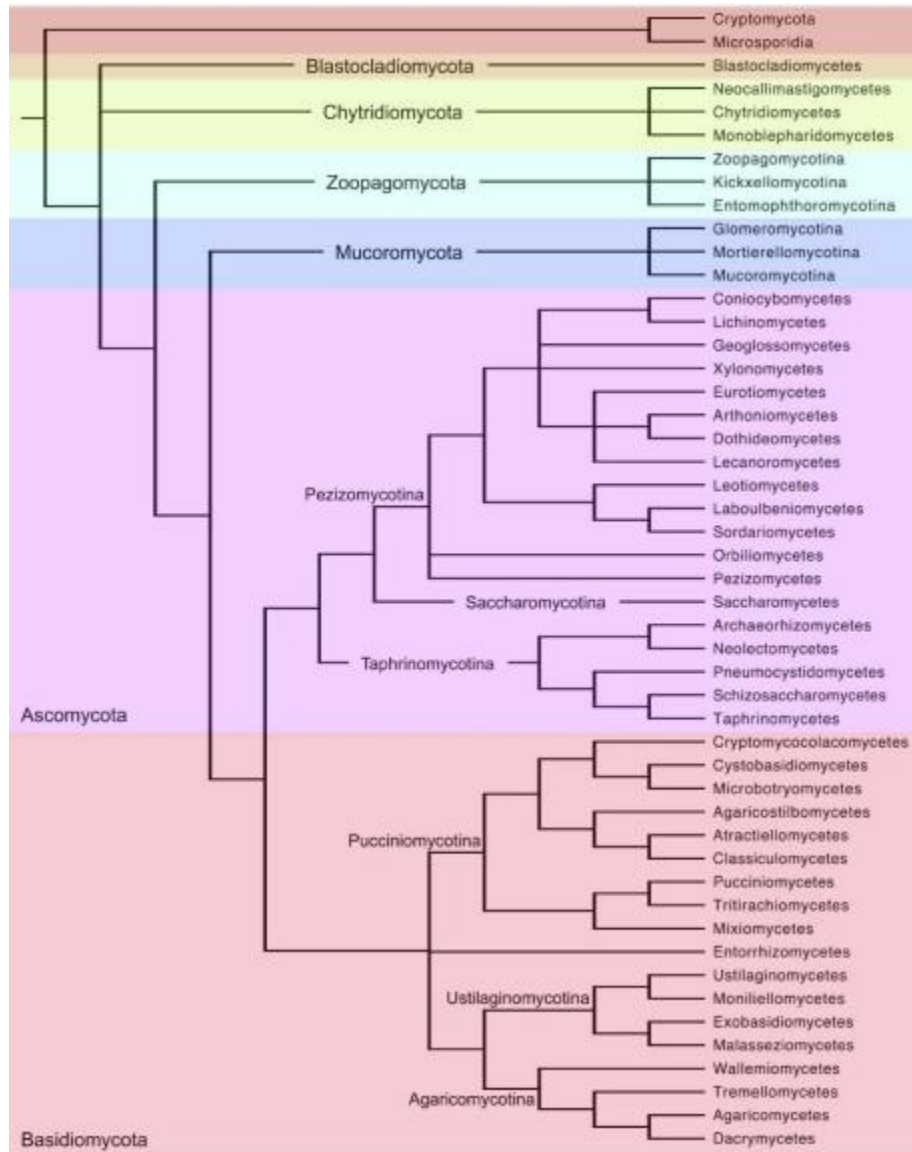


Figura 1. 8 Classificação do Reino Fungi baseada em dados genéticos e moleculares [adaptado de (65)]

Os fungos são heterotróficos e caracterizam-se por uma nutrição osmotrófica, que assenta na secreção de enzimas extracelulares que hidrolisam extracelularmente vários compostos,

sendo as substâncias resultantes absorvidas através da parede e membrana das células/hifas. Estas enzimas permitem a obtenção de unidades básicas de hidratos de carbono (glucose) e azoto absorvíveis a partir de oligossacáridos e compostos azotados complexos dificilmente absorvíveis (Tabela 1.1). Também são obtidos por via osmotrófica nutrientes como enxofre, potássio, magnésio, ferro, cobre, cálcio, manganésio, zinco, molibdénio, vitaminas (nomeadamente B1 e B7) e outros elementos cruciais para o funcionamento das células fúngicas.^(62,66)

Tabela 1. 1 Exemplo de algumas enzimas fúngicas utilizadas na hidrólise de polissacarídeos

Substratos	Enzima
Celulose	Endoglucanase, celobiohidrase
Lignina	Ligninase
Amido	Amilase
Xilano	Xilanase

Os fungos podem ser saprófitas, quando o alimento deriva de material orgânico em decomposição, comensais quando estabelecem um relacionamento com o hospedeiro sem prejudicar a saúde do mesmo, ou parasitas, quando a relação estabelecida com os hospedeiros permite adquirir alimento a partir do tecido vivo destes, resultando num conseqüente estado de patogenia e num cenário de infeção micótica.⁽⁶²⁻⁶⁶⁾

A maioria dos fungos possui respiração aeróbica, no entanto algumas espécies podem recorrer à fermentação ou até depender de respirações anaeróbicas. Os metabolitos primários característicos dos fungos consistem em aminoácidos essenciais, ácido cítrico, etanol, glicerol, entre outros. O metabolismo secundário assume um enorme relevo neste grupo microbiano pois alguns metabolitos secundários apresentam bioatividades promitentes, destacando-se, entre eles (Figura.1.9), o antibiótico penicilina G (r), o composto imunossupressor ciclosporina A (s) e antidiabético lovastatina (t).^(62,66)

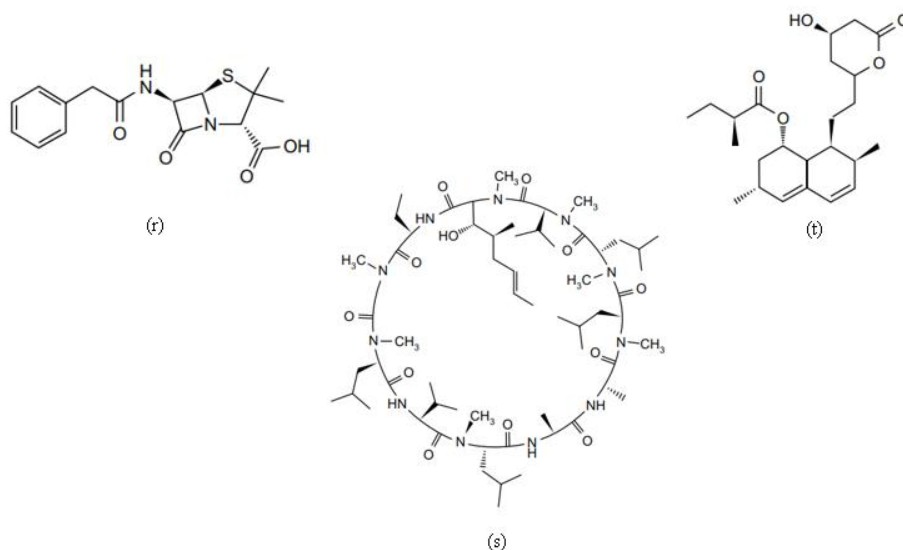


Figura 1. 9 Exemplos de metabolitos secundários fúngicos aplicados em tratamento clínico: (r) penicilina G; (s) ciclosporina A; (t) lovastatina [adaptado de (66)]

1.3.2. Espécies fúngicas utilizadas no presente estudo: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*

O género *Candida* engloba os fungos patogénicos oportunistas mais comuns, encontrados em ambientes clínicos, dos quais *C. albicans* é um dos mais estudado. Esta espécie é largamente distribuída na população humana, cuja presença e crescimento decorre no intestino, atuando como agente infeccioso caso o hospedeiro atinja um estado imunocomprometido, permitindo uma proliferação do fungo para várias regiões anatómicas, nomeadamente nas regiões oral e vaginal, podendo ocorrer as situações de candidíase invasivas.⁽⁶²⁻⁶⁷⁾

C. albicans (Figura 1.10) é uma espécie dimórfica, assumindo uma organização somática de levedura, hifa ou pseudohifa, consoante as condições ambientais (p.e. temperatura) e os requisitos do contexto em causa (p.e. reprodução e indução de virulência). A sua parede celular exhibe as estruturas chaves para promover a sua patogenicidade, entre elas manoproteínas, β -1,3- e β -1,6-glucano e quitina. O mecanismo generalizado da sua patogénese pressupõe a adesão do fungo a células epiteliais do hospedeiro, mediada por moléculas de adesina [p.e. proteína da parede hifal 1 (Hwp1) e proteína semelhante à aglutinina 3 (Als3)], seguida de endocitose ou penetração dos tecidos promovida pela formação de hifas. Ao atingir tecidos

internos, verifica-se a entrada do fungo na corrente sanguínea e assim a sua disseminação para vários órgãos. As situações em que ocorrem a maior parte das infeções invasivas e sistémicas causadas por espécies de *Candida*, estão associadas a situações em que as defesas primárias do hospedeiro estão comprometidas, tais como cirurgias, implantação de cateteres, quimioterapia, entre outras. As células de *C. albicans* revelam um conjunto de estratégias para superar os ataques imunológicos e a ação de antifúngicos, incluindo a formação de biofilmes.⁽⁶²⁻⁶⁸⁾

Dados referentes à distribuição epidemiológica de espécies do género *Candida* em Portugal apontaram que, tal como no restante contexto mundial, as infeções invasivas provocadas por este género são a quarta principal causa de infeções nosocomiais, que se associam a elevados valores mortalidade. *C. albicans* é a espécie mais frequente nos isolados de candidémias, no entanto, a sua predominância tem diminuído nos últimos anos, acompanhada do aumento de outras espécies, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.^(66,69,70) Segundo um estudo realizado por Costa-de-Oliveira et al (2008), a partir de dados obtidos em 2004 de isolados extraídos de culturas de sangue de 117 pacientes com fungemia, admitidos no Hospital São João, *C. albicans* era o isolado mais frequente, representando 35% das amostras isoladas.⁽⁶⁹⁾ Outro estudo efetuado por Sabino et al (2017), admitia que a segunda infeção fúngica mais comum em Portugal é a candidíase vulvovaginal recorrente, estimando que acerca de 150 700 mulheres, entre as idades de 15 e 50 anos apresentam este problema anualmente. Em indivíduos imunocomprometidos afetados com HIV, as taxas estimadas de candidíase oral ou esofágica foram de 19,5 e 16,8 por cada 100 000 pacientes infetados, respetivamente. Com base em estudos efetuados entre 2010 e 2011, deduziu-se que 2,19 casos de candidémia são admitidos em ambiente hospitalar por cada 100 000 habitantes, num total de 231 casos a nível nacional por ano, onde *C. albicans* era espécie mais prevalente, causadora cerca de 40% das situações.⁽⁷¹⁾



Figura 1. 10 Apresentação microscópica de *C. albicans* (40X) [adaptado de (73)]

O género *Cryptococcus* compreende espécies fúngicas que possuem células arredondadas ou ovais encapsuladas, que apesar de apresentarem a capacidade de infectar indivíduos sãos, a sua patogenicidade e severidade são consideráveis em pacientes imunocomprometidos. Os indivíduos são maioritariamente infetados devido à inalação de propágulos existentes no ambiente circundante, conduzindo a infeções de carácter local ou com potencial para se disseminar, atingindo o sistema nervoso central (SNC), que em casos de imunossupressão, poderá agravar a infecciosidade. *C. neoformans* é uma espécie presente nas fezes de aves, solo e madeira em decomposição. A maioria das espécies deste género, são responsáveis por doenças em pacientes incapacitados (vírus da imunodeficiência humana (HIV), transplantados, portadores de doenças hematológicas, diabetes mellitus, sendo excecional a indução de doença em indivíduos imunocompetentes.^(62-66,74)

As células de *C. neoformans* (Figura.1.11) são circundadas por uma cápsula polissacarídea, e possuem melanina na parede celular, que permitem resistir aos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro como também suprimem a imunidade celular e humoral, mediante o bloqueio da opsonização de anticorpos de complemento e anticriptocócicos, e criação duma carga negativa que provoca a repulsão eletrostática entre as células fúngicas e células efetoras hospedeiras e restringe a produção de óxido nítrico (efeito tóxico contra células criptocócicas) das células hospedeiras.^(62-64,74)

A distribuição epidemiológica de *Cryptococcus* é mais prevalente no continente europeu, onde a variante *neoformans* corresponde a 30% dos isolados.⁽⁶⁴⁾ Estudos de Costa-de-Oliveira et al (2007) com base nos isolados de amostras de sangue que evidenciavam uma contaminação

por microrganismos, permitiram calcular que cerca de 10,3% se deviam a *C.neoformans*, com proeminência entre indivíduos com HIV. ⁽⁶⁹⁾ Sabino et al avaliaram que em 2014, entre a população portadora de HIV infetada com patógenos fúngicos, 13 indivíduos evidenciaram um desenvolvimento de criptococose extrapulmonar, correspondendo a uma proporção de 0.12 infetados por cada 100 000 habitantes. Este estudo permitiu concluir que Portugal apresentou uma maior incidência anual de meningite induzida por *Cryptococcus* em comparação com outros estudos europeus semelhantes.⁽⁷¹⁾

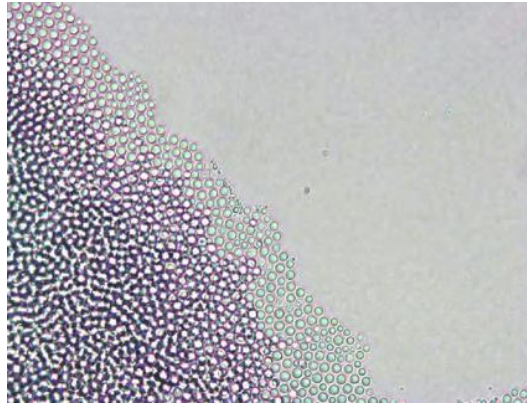


Figura 1. 11 Apresentação microscópica de *C. neoformans* (10X) [adaptado de (73)]

O género *Saccharomyces* integra entre 10 e 16 espécies de fungos, do qual a mais conhecida é *S. cerevisiae* (Figura 1.12). Este fungo é caracterizado por se reproduzir por gemulação, exibindo blastosporos ovais e ocasionalmente pseudohifas e ascósporos. Possui uma parede celular essencialmente composta por glucano β -1,3 e 1,6 que está associada às proteínas externas GPI-CWP (proteínas da parede celular modificadas por cadeias de glicosilfosfatidilinositol) e Pir-CWP (proteínas da parede celular com repetições internas), e cadeias grandes de manose e de quitina.^(62,64,66)

A espécie *S. cerevisiae* é reconhecida pela sua ação como agente fermentativo, envolvido na produção de inúmeros produtos alimentares, tais como pão, cerveja e vinho. A espécie *S. boulardii* é considerada um como agente probiótico e tem sido encontrado na microbiota do trato digestivo.^(62,64,66,75,76)

Tal como outros fungos oportunistas, *S. cerevisiae* tem sido associada a situações de patogenicidade em indivíduos imunocomprometidos e com comorbilidades. A sua presença maioritária na zona intestinal, dotada de enorme vascularização, permite o desenvolvimento

de infecções sistêmicas ou ao nível das mucosas. As estratégias adotadas para garantir a sua virulência nas condições adequadas envolvem a resistência a espécies oxidativas e crescimento pseudohifal.^(64,75,76)

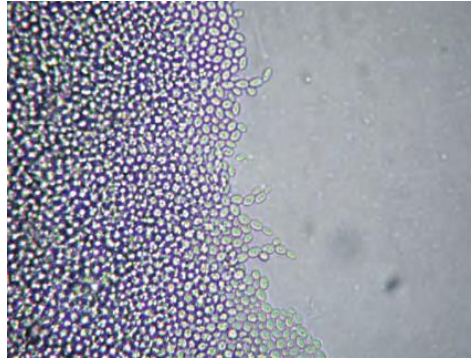


Figura 1. 12 Apresentação microscópica de *S. cerevisiae* (10X) [adaptado de (73)]

1.3.3. Fatores de virulência

Para que possam provocar um estado infeccioso, os fungos deverão apresentar algumas características (fatores de virulência) tais como capacidade de se desenvolver em ambientes com uma temperatura média de 37 °C, capacidade de utilizar uma vasta gama de fontes de carbono, azoto e de outros componentes nutricionais essenciais (p.e. ferro) e de conseguir reconhecer e adaptar-se a condições características da fisiologia humanas.^(63,64,77,78) Outros fatores de virulência envolvem estruturas presentes na superfície da parede celular para permitir a sua sobrevivência contra ataques inerentes do sistema imunológico do hospedeiro, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilmes, modificação na regulação dos genes e produção de sideróforos para potenciar a captação de ferro, entre outros.^(63,64,77,78) Na Tabela 1.2 estão resumidos alguns mecanismos de virulência característicos das células fúngicas.

Tabela 1. 2 Alguns mecanismos promotores de virulência mais comuns [adaptado de (64)]

Tipo de fator de virulência	Exemplos	Efeito	Espécies associadas
Estruturas de superfície	Cápsula polissacarídea	Imunomodulador e proteção contra fagocitose	<i>C. neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>
	Melanina	Proteção contra stress oxidativo	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	Proteínas e glicoproteínas (Bad1, SOWgp, Hsp60, Hsp82 e Yps3)	Adesão a células hospedeiras, imunomodulação e stress antimicrobiano	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Coccidioides posadasii</i> e <i>H. capsulatum</i>
Enzimas hidrolíticas	Catalase	Desativação de espécies reativas de oxigênio do hospedeiro	<i>C. albicans</i>
	Lipase e fosfolipase	Adesão, penetração e degradação de células hospedeiras	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>
	Urease	Invasão do sistema nervoso central	
	Superóxido dismutase	Defesa antioxidante	<i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>
	Proteinase Arginase 1	Degradação de proteínas essenciais do hospedeiro Redução da produção de óxido nítrico	<i>C. immitis</i> e <i>C. posadasii</i>
Biofilmes		Promoção da produção de gliotoxina	<i>Aspergillus fumigatus</i>
		Promoção da aderência a superfícies plásticas	<i>C. albicans</i>
Sideróforos		Regulação da homeostasia do ferro	<i>C. albicans</i>
Modificação fenotípica		Alteração estrutural e dimensional da cápsula e eficácia de penetração de tecidos profundos	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>

1.3.4. Infecções fúngicas humanas

As infecções fúngicas (micoses) são, em geral agrupadas, de acordo com os tecidos que são infetados. Assim, estas infecções são classificadas como superficiais, cutâneas e subcutâneas.

As infecções fúngicas são também classificadas como micoses endêmicas e oportunistas (Tabela 1.3).⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

As micoses superficiais, são infecções que se limitam a regiões mais externas da pele e dos pelos. São normalmente causadas por fungos comensais ou com uma carga patológica reduzida, tendo impacto ao nível cosmético.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

As micoses cutâneas, são infecções que se expressam nos tecidos queratinizados, presentes na pele, cabelo e unhas. Quando os sintomas são mais evidentes, reporta-se prurido, descamação, enfraquecimento do cabelo, manchas na pele em forma de anel e unhas espessadas e descoloridas.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

As micoses subcutâneas ocorrem principalmente nos trópicos e subtropicais, associadas às camadas mais internas da pele (córnea, músculos e tecido conjuntivo), geradas por um vasto conjunto de fungos que diferem taxonomicamente. Em geral são infecções limitadas (com efeito local), raramente progredindo para uma situação sistémica. Na presença deste tipo de micoses, observa-se o desenvolvimento de abscessos, úlceras que dificilmente se curam, que podem conduzir à destruição dos tecidos envolvidos.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

As micoses sistémicas podem ser primárias ou oportunistas. As micoses primárias são causadas por fungos que se caracterizam por possuir dimorfismo térmico, podendo existir como leveduras ou esférulas a 37 °C ou fungos filamentosos a 25 °C. Estes fungos são patogénicos virulentos, capazes de causar doença em indivíduos imunocompetentes e estão geralmente confinados a regiões geográficas e ambientais específicas. Estas micoses endêmicas são referidas como sistémicas, uma vez que possuem uma elevada capacidade de se disseminar, primeiramente produzindo uma infeção primária nos pulmões, acompanhada com uma subsequente invasão de outros tecidos e órgãos.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

As micoses oportunistas, englobam infeções causadas por espécies de fungos, pertencentes à microbiota comensal humana e espécies ambientais. Estes organismos exibem uma virulência relativamente baixa ou limitada, com exceção de *C. neoformans* e *C. gattii*, porém, podem causar infeção em indivíduos debilitados, imunossuprimidos ou portadores dispositivos protéticos implantados ou cateteres vasculares. Em suma, qualquer fungo pode assumir o papel de um patógeno oportunista, quando encontradas as condições adequadas.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

Tabela 1. 3 Exemplos de agentes etiológicos causadores de micoses [adaptado de (63)]

Micoses	Exemplo	Fungo causador	
Superficiais	Pitíriase versicolor	<i>Malassezia furfur</i>	
	Piedra preta	<i>Piedraia hortae</i>	
	Piedra branca	<i>Trichosporon</i> spp.	
	Tinea nigra	<i>Hortae werneckii</i>	
Cutâneas	Dermatofitoses	<i>Trichophyton</i> spp.	
		<i>Epidermophyton</i> spp.	
		<i>Microsporums</i> spp.	
	Onicomicose	<i>Candida</i> spp.	
		<i>Aspergillus</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp. <i>Geotrichum</i> spp.	
Tinea unguium	<i>Trichophyton</i> spp. <i>Epidermophyton floccosum</i>		
Subcutâneas	Esporotricose	<i>Sporothrix schenckii</i>	
	Cromoblastomicose	<i>Fonsecaea</i> spp.	
		<i>Phialophora</i> spp.	
	Maduromicose	<i>Curvularia lunata</i> <i>Madurella</i> spp.	
		<i>Scedosporium</i> spp. <i>Acremonium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp.	
Sistêmicas (Micoses primárias causadas por fungos patogénicos dimórficos)	Blastomicose	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	
	Coccidioidomicose	<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	
	Histoplasmose	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
	Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	
	Peniciliose	<i>Penicillium marneffeii</i>	
Sistêmicas (Micoses oportunistas)	Aspergilose	<i>Aspergillus</i> spp.	
	Candidíase	<i>Candida</i> spp.	
	Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	Hialohifomicose	<i>Acremonium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp. <i>Scedosporium</i> spp.	
		Mucormicose	<i>Rhizopus</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Lichtheimia corymbifera</i>

1.3.5. Agentes antifúngicos

Existe uma diversidade de compostos com atividade biológica útil no tratamento das diversas micoses. Os fármacos utilizados na terapia contra as infecções fúngicas são tradicionalmente agrupados como agentes sistêmicos ou tópicos, com alguns antifúngicos incluídos em ambos grupos. Estão descritas 5 classes de antifúngicos: os azoles, as alilaminas, os equinocandinas, os polienos e os antimetabolitos. Os compostos incluídos na 4 primeiras classes atuam inibindo os processos de síntese dos componentes da membrana ou parede celular, enquanto os antimetabolitos intervêm no mecanismo de síntese de ADN.^(63-66,79-83)

Os azoles são estruturalmente divididos em imidazoles (dois azotos presentes no anél de azole), e triazoles (três azotos presentes no anél de azole). Tanto os imidazóis como os triazóis inibem a enzima monooxigenase lanosterol 14- α -demetilase (dependente do citocromo P450), responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, através da ligação ao grupo heme do átomo de ferro presente no centro ativo, ocorrendo então uma acumulação de 14- α -metilesteróis tóxicos, o que interfere no crescimento e proliferação das células fúngicas. Os imidazóis são usados principalmente no tratamento de infecções das mucosas, com exceção do cetoconazole que não dispõe atividade sistêmica, ao passo que todos os triazoles, apresentam atividade sistêmica, incluindo o fluconazole, itraconazole, voriconazole e posaconazole. Estes compostos revelam uma atividade fungistática contra espécies invasivas, tais como *Candida* spp. e *C. neoformans*, porém, o itraconazole, o voriconazole e o posaconazole possuem uma atividade fungicida contra espécies do género *Aspergillus*. Estão associados a efeitos adversos graves, tais como toxicidade gástrica e hepática, náuseas, vômitos e erupções cutâneas. Esta classe é particularmente importante em pacientes com doenças hematológicas e transplantados de órgãos sólidos, sendo indicada na profilaxia antifúngica ou no tratamento de infecção fúngica.^(63-66, 79-84) Recentemente têm sido desenvolvidos outros triazoles tais como o albaconazole que é um azole de largo espectro e excelente biodisponibilidade oral e o opelconazole que se trata de um composto otimizado para a administração inalatória através de nebulizadores.^(85,86)

As alilaminas incluem a terbinafina e a naftifina que, respetivamente, apresentam efeito sistêmico e ação local. Inibem a esqualeno epoxidase, resultando no decréscimo em ergosterol e um acréscimo de esqualeno na membrana celular. Recorre-se estes compostos em terapias

combinada com azoles, proporcionando uma interação sinérgica (ambas classes atuam na via biossíntese de ergosterol em diferentes etapas) ou em circunstâncias de resistência a azoles no tratamento contra determinadas espécies de *Candida*^(63,66,79,81,82,84,87)

O antimetabolito 5-fluorocitosina (5-FC), um análogo do nucleotídeo citosina, entra nas células via citosina permease e depois é convertido em 5-fluorouracilo (5-FU) pela citosina desaminase quando presente no citoplasma, sendo posteriormente incorporada nos ácidos nucleicos sob a forma de ácido 5-fluoridílico durante a síntese dessas biomoléculas, acabando por bloquear a síntese de proteínas ou inibir a replicação do DNA. Não é utilizado em monoterapia pois, suscetibiliza o hospedeiro para a formação de resistências secundárias. Tendencialmente utiliza-se em combinação com a anfotericina B ou o fluconazole, no tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Candida*, *Rhodotorula*, *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, espécies fúngicas causadoras de cromoblastomicose e alguns fungos dematiáceos.^(63-64,66,79,81-84,87)

As equinocandinas incluem a anidulafungina, a caspofungina e a micafungina e correspondem à mais recente classe de antimicóticos introduzida no mercado, representando uma alternativa terapêutica, de modo minimizar situações promotoras de resistência a azoles. Atuam como inibidores não competitivos da β -1,3-D-glucano sintase, reduzindo os níveis de β -glucano na parede celular, tornando a célula suscetível a lise osmótica. Ao atuarem na via de biossíntese da parede celular, exclusiva para células fúngicas, apresentam uma menor toxicidade clínica que os outros agentes antimicóticos. Embora apresentem uma eficiente atividade contra *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. demonstram-se incapazes de combater infecções causadas por *Cryptococcus* spp.^(63-66,79,81-84) A sua administração decorre exclusivamente por via intravenosa, daí um incentivo na investigação de inibidores da β -1,3-D-glucano sintase inovadores, tais como a aminocandina (derivado da fermentação semissintética de *Aspergillus sydowii*), a rezafungina (derivado da anidulafungina e primeiro elemento da 2ª geração de equinocandinas) e SCY-078 (derivado semissintético enfumafungina) que é ativo quando administrado oralmente.^(83,87)

Os polienos são constituídos por um anel de lactona, uma cadeia lipofílica rígida contendo três a sete ligações duplas e uma porção hidrofílica flexível contendo vários grupos hidroxilo, destacando-se anfotericina B, a natamicina e a nistatina como fármacos representativos. O mecanismo de ação destes compostos está relacionado com a ligação ao ergosterol, presente

na membrana celular, originando um conjunto de canais iônicos que provocam um desequilíbrio da integridade osmótica, conduzindo à lise celular. Outro mecanismo da atividade antimicrobiana da anfotericina B, está relacionada com a geração de radicais livres tóxicos, via a oxidação do próprio composto. A anfotericina B apresenta atividade antifúngica contra infecções invasivas sistêmicas geradas por espécies de *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus*, enquanto a nistatina e a natamicina são preferíveis no tratamento de infecções tópicas dado à sua baixa absorção. Todos os elementos desta classe exibem ligeira toxicidade associada à afinidade a esteróis presentes na membrana celular humana (colesterol), destabilizando a mesma, sendo então preferível a utilização de formulações lipossomais para minimizar efeitos indesejáveis. ^(63-66,79,81-84)

1.3.6. Compostos antifúngicos em desenvolvimento

A constante necessidade de ultrapassar problemas de aumento de casos de infecções provocadas por espécies fúngicas invasivas que conduzem uma maior taxa mortalidade, e aumento de resistências (nomeadamente azoles), faz com que seja imperativo o desenvolvimento de novos agentes com mecanismos de ação inovadores, biodisponibilidade melhorada e esquemas posológicos mais acessíveis. ^(83,85,86,87) Na Tabela 1.6 destacam-se agentes promitentes, cujos mecanismos de ação divergem dos atualmente evidentes nas diferentes classes de antifúngicos estabelecidas e as potenciais aplicações terapêuticas.

Tabela 1. 4 Resumo de alguns agentes antifúngicos inovadores e em avaliação clínica [adaptado de (87)]

Agente	Classe	Mecanismo de ação	Potencial utilização terapêutica
Aureobasidina A	Inibidor de glicolípidos	Inibição do inositol fosforilceramida sintase	<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i>
Manogepix	Inibidor da Glicosilfosfatidilinositol	Interrupção da síntese de Gwt1 (proteína 1 de transferência de parede ancorada por GPI) através da inibição de inositol aciltransferase	Atividade <i>in vitro</i> contra uma ampla gama de leveduras e bolores (<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Scedosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Coccidioides</i> spp. e <i>Lomentospora prolificans</i>)
Nikkomicina	Inibidor da quitina sintase	Inibição competitiva da quitina sintase	Em combinação com equinocandinas, eficaz contra coccidioidomicose, histoplasmose e blastomicose
Olorofim	Orotomida	Inibição de diidroorotato desidrogenase	<i>Aspergillus</i> spp. e <i>Scedosporium</i> spp.

1.4. Objetivo

A finalidade desta dissertação foi a determinação da potencial atividade antifúngica presente em compostos de BIMs. Na primeira fase, procedeu-se à síntese de 10 derivados BIMs via reação conjugada de ciclo adição hetero Diels-Alder e caracterização dos respetivos parâmetros físico-químicos. Numa segunda fase, avaliou-se a capacidade antifúngica dos compostos

sintetizados nas espécies de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*, utilizando o método de Kirby-Bauer.

2. Materiais e métodos

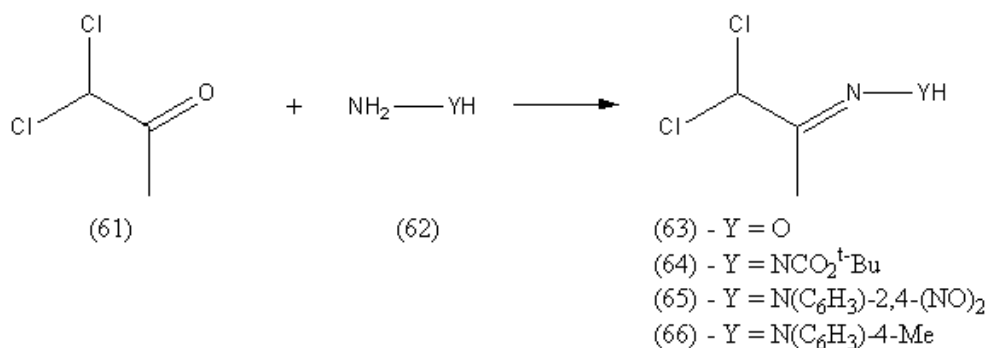
2.1. Síntese da oxima e das hidrazonas precursoras de nitroso- e azo-alcenos

Os reagentes e solventes foram utilizados tal como foram recebidos, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional desde a sua compra.

As reações efetuadas foram controladas através de 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 UV de 254 nm ou por oxidação em atmosfera a iodo.

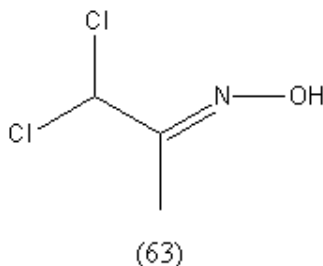
No isolamento e/ou purificação dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia de flash seca (dry flash), utilizando-se sílica-gel de tipo G contendo 13% de sulfato de cálcio, como a fase estacionária e apolaridade do eluente ajustada de acordo com a polaridade do composto final. Recristalização do solvente apropriado também foi técnica utilizada na purificação de alguns compostos.

Os nitroso- e azo-alcenos são gerados *in situ* a partir das respectivas oximas e hidrazonas α -dihalogenadas. Neste trabalho, estas, por seu lado foram preparadas a partir da respetiva 1,1-dicloroacetona (Esquema 2.1).



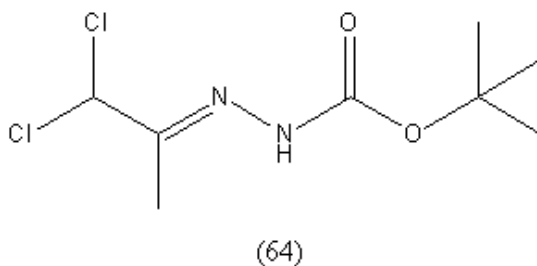
Esquema 2. 1 Estratégia geral para a preparação de oximas e hidrazonas

2.1.1. 1,1-dicloroacetona oxima (63)



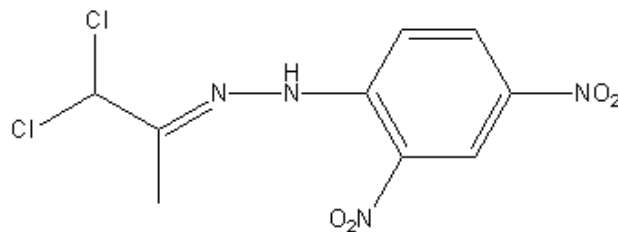
A uma solução de 1,1-dicloroacetona (1 mL, 10 mmol), em etanol (60 mL), foi adicionado hidrocloreto de hidroxilamina (0,7 g, 30 mmol). A mistura foi deixada em agitação durante 36 horas à temperatura ambiente. Evaporou-se o solvente e de seguida adicionou-se água (50 mL) e extraiu-se o produto com acetato de etilo (2 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e evaporou-se o solvente. A oxima obtida como um óleo que cristaliza num sólido incolor no frigorífico, com um rendimento de 59% (0,85 g). p.f: 38-40°C; IV(KBr): 3440, 1780, 1400, 739 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.32 (sl, 1H, OH), 6.29 (s, 1H), 2.14 (s, 3H) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 155.9, 70.3, 8.7 ppm.

2.1.2. 1,1-dicloroacetona *t*-butoxicarbonil-hidrazona (64)



A uma solução de 1,1-dicloroacetona (1 mL, 10 mmol), em éter etílico (60 mL), foi adicionado *t*-butil carbazato (1,32 g, 10 mmol). A mistura foi deixada em agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Durante esse período a hidrazona vai precipitando. Filtração sob vácuo, lavagem com éter etílico frio e secagem, originaram 1,33 g de um sólido branco correspondente a um rendimento de 55%. p.f: 130-132°C; IV(KBr): 3197, 2983, 1708, 1537, 1253, 1144, 729 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.63 (sl, 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.

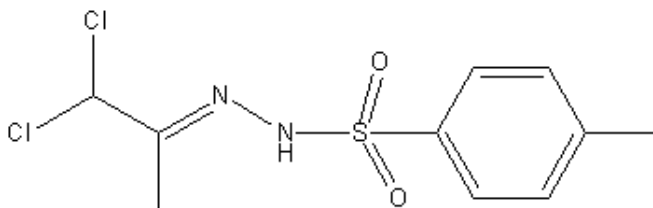
2.1.3. 1,1-dicloroacetona 2,4-dinitrofenil-hidrazona (65)



(65)

A uma suspensão de 2,4-dinitrofenilhidrazina (33% H₂O) (2,5 g, 8,9 mmol) em dietil fosfíto (35 mL), adicionou-se 1,1-dicloro acetona (1,0 mL, 10 mmol). Após a adição verifica-se a solubilização da hidrazina. Após 6 horas à temperatura ambiente adicionaram-se 25 mL de água. O sólido alaranjado que se forma foi filtrado sob vácuo e lavado éter petróleo. Após secagem obtêm-se 2,29 g da hidrazona (71%). p.f: 108-110°C; IV(KBr): 3094, 2983, 1617, 1594, 1514, 1338, 1288, 1105, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (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; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 150.3, 116.8, 144.5, 139.3, 130.6, 130.2, 123.2, 72.5, 10.4 ppm.

2.1.4. 1,1-dicloroacetona *p*-toluenosulfonil-hidrazona (66)



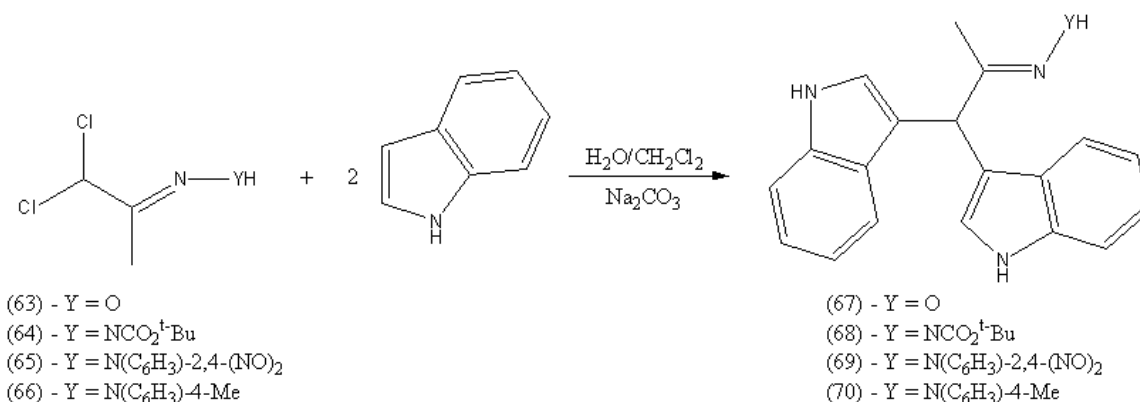
(66)

A uma solução de *p*-toluenosulfonil hidrazina (2,8 g, 15 mmol) em ácido propiônico (25 mL), foi adicionada 1,1-dicloroacetona (1,7 mL, 18 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 horas. Foi adicionado então ciclohexano (20 mL) e a mistura da reação foi deixada no congelador, num período de 16 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com ciclohexano frio. Após secagem, foram obtidas 3,5 g (80%) de um sólido levemente amarelado. p.f: > 136,8 °C; IV(KBr): 3215, 1398, 1338, 1182, 1514, 664 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.00 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 6.18 (br s, 1H, CH), 7.34 (d, J = 8,0 Hz, 2H, Ar), 7.82 (d, J = 8,0 Hz,

2H), 8.07 (br s, 1H, NH) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 10.0, 21.7, 72.3, 127.9, 129.8, 134.8, 144.8, 150.4 ppm.

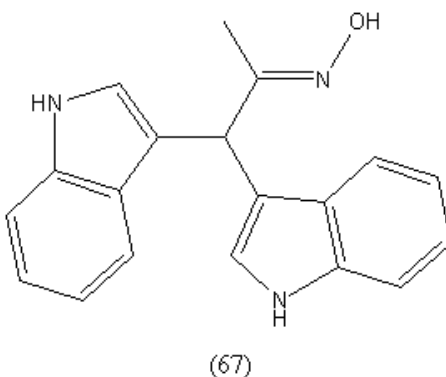
2.2. Síntese dos BIMs

Como já foi referido anteriormente (3), os BIMs foram sintetizados a partir da reação dupla e consecutiva de HDA dos heterodienos, gerados pela ação da base, com o indole (Esquema 2.2).



Esquema 2. 2 Método geral de preparação dos BIMs

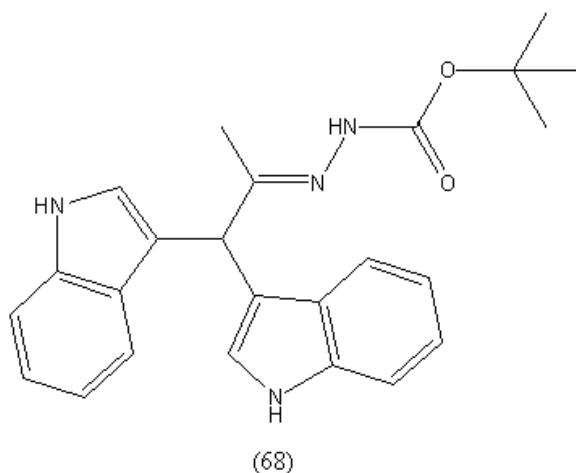
2.2.1. 1-(1-Hidroxiimino)etil bis(3-indolil)metano (67) (C10)



A 1,1-diclorooxima (63) (0,08 g, 0,54 mmol) foi adicionada à mistura de indole (0,28, 2,16 mmol) e carbonato de sódio (0,572 g, 5,4 mmol) em H₂O/CH₂Cl₂ como solvente (10 + 1,5 mL). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Fez-se então a extração com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), secagem com sulfato de magnésio e evaporação do solvente originou o

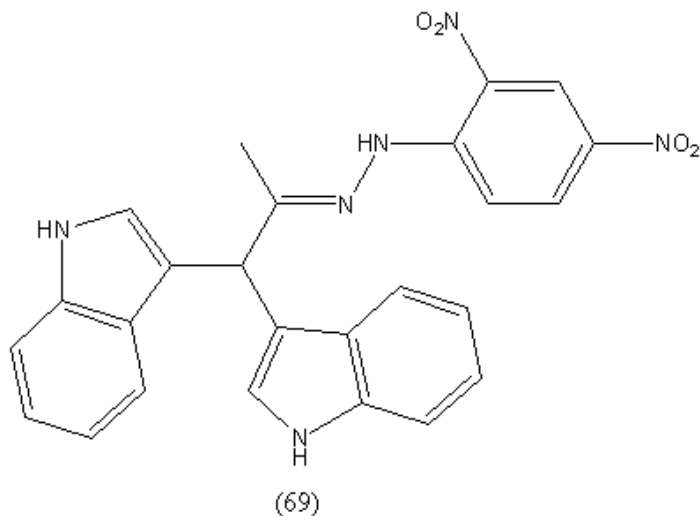
produto impuro que foi sujeito a cromatografia de flash. Eluição com acetato de etilo/hexanos com gradiente de 1:3 para 1:1 produziu um sólido branco (0,1 g, 56%). p.f: 120-121°C; IV(KBr): 3393, 3050, 1472, 1329, 1011, 945, 738 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6): δ = 10.44 (br s, 1H, OH), 7.48 (d, J = 8,0 Hz, 2H, Ar), 7.12-7.16 (m, 4H, Ar), 6.99 (t, J = 7,6 Hz, 2H, Ar), 5.38 (br s, 1H, CH), 3.74 (s, 6H, CH₃), 1.78 (s, 3H, CH₃) ppm; RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6): δ = 156.7, 136.7, 127.8, 127.1, 121.1, 119.0, 118.4, 113.4, 109.6, 32.3, 12.3 ppm.

2.2.2. 1-[(1-^tbutoxicarbonilhidrazono)]etil bis(3-indolil)metano (68) (C1)



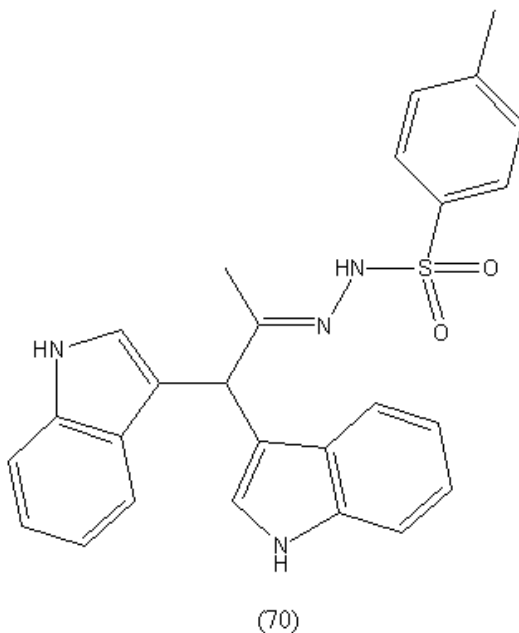
A hidrazona (64) (0,20 g, 0,83 mmol) foi adicionada à mistura de indole (0,39 g, 3,30 mmol) e carbonato de sódio (0,88 g, 8,3 mmol) em H₂O/CH₂Cl₂ como solvente (15 + 3 mL). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Fez-se então a extração com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), secagem e com evaporação do solvente originou o produto bruto que foi sujeito a cromatografia de flash. Eluição com a mistura de acetato de etilo/hexanos com gradiente de 1:3 para 1:2 produziu um sólido branco (0,18 g, 54%). p.f: > 180°C; IV(KBr): 3435, 3263, 1714, 1498, 1456, 1365, 1248, 1161, 1124 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6): δ = 1.47 (s, 9H, CH₃), 1.83 (s, 3H, CH₃), 5.38 (s, 1H, CH), 6.93 (t, J = 7,2 Hz, 2H, Ar), 7.06 (t, J = 7,2 Hz, 2H, Ar), 7.16 (d, J = 1,6 Hz, 2H, Ar), 7.36 (d, J = 8,0 Hz, 2H, Ar), 7.44 (d, J = 8,0 Hz, 2H, Ar), 9.35 (br s, 1H, NH), 10.91 (br s, 2H, NH) ppm; RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6): δ = 14.4, 28.1, 43.0, 78.9, 111.4, 114.1, 118.3, 118.9, 120.9, 123.4, 126.8, 36.2, 153.3, 155.4 ppm.

2.2.3. 1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]etil bis(3-indolil)metano (69) (C2)



A hidrazona (65) (0,26 g, 0,83 mmol) foi adicionada à mistura de indole (0,39 g, 3,3 mmol) e carbonato de sódio (0,88 g, 8,3 mmol) em H₂O/CH₂Cl₂ como solvente (15 + 3 mL). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Fez-se então a extração com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), secagem com e evaporação do solvente originou o produto que foi sujeito a cromatografia a flash, eluição com acetato de etilo/hexanos com gradiente de 1:3 para 1:2 produziu um sólido laranja (0,25 g, 63%). p.f. > 173.5 °C (dec); IV (KBr): 3413, 3320, 1678, 1590, 1516, 1421, 1334, 1312, 1280, 1088 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6): δ = 2.13 (s, 3H, CH₃), 5.63 (s, 1H, CH *meso*), 6.92-6.97 (m, 2H, Ar), 7.05-7.10 (m, 3H, Ar), 7.25 (br s, 1H, Ar), 7.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, Ar), 7.49 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, Ar), 7.89-7.93 (m, 1H, Ar), 8.34-8.37 (m, 1H, Ar), 8.86-8.88 (m, 1H, Ar), 10.88 (br s, 1H, NH), 11.01 (br s, 2H, NH) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*6) δ = 14.4, 43.2, 111.5, 113.2, 116.1, 118.5, 118.8, 121.1, 123.0, 123.8, 126.7, 129.2, 130.1, 136.3, 136.8, 144.9, 160.5 ppm.

2.2.4. 1-[1-(p-Toluenosulfonilhidrazono)]etil bis(3-indolil)metano (70) (C3)

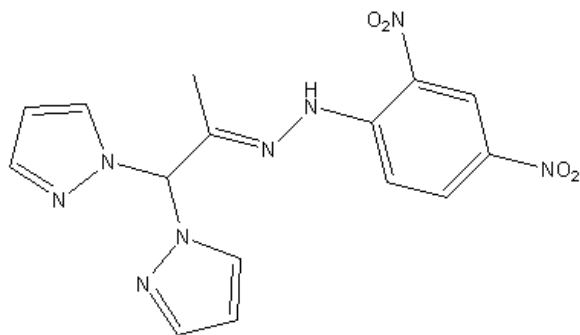


A hidrazona (66) (0,39 g, 0,83 mmol) foi adicionada à mistura de indole (0,39 g, 3,3 mmol) e carbonato de sódio (0,88 g, 8,3 mmol) em H₂O/CH₂Cl₂ como solvente (15 + 3 mL). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 5 horas. Fez-se então a extração com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), secagem com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente originou um sólido que foi sujeito a cromatografia de flash. Eluição com acetato de etilo/hexanos com gradiente de 1:3 para 1:2 produziu um sólido levemente alaranjado (0,16 g, 41%). p.f. 158- 160 °C (éter etílico); IV (KBr) : 3408, 3221, 1458, 1336, 1165, 1092, 742, 677, 669 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 1.77 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 5.27 (s, 1H, CH), 6.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.04(t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, Ar), 7.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar), 7.33 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, Ar), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, R), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 9.99 (br s, 1H, NH), 10.91 (br s, 2H, NH) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*⁶) δ = 14.5, 21.2, 43.0, 111.3, 113.2, 118.3, 118.8, 120.9, 123.4, 126.6, 127.6, 129.3, 136.2, 136.3, 142.9, 159.3 ppm.

2.3. Outros compostos testados

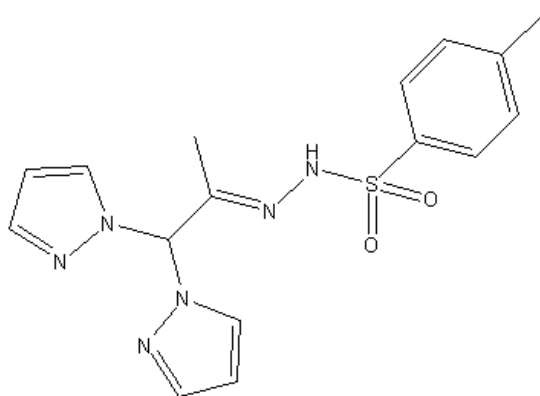
Os compostos a seguir referenciados, preparados e disponibilizados pelo grupo de química orgânica do laboratório 3.33, foram também objeto deste nosso estudo e avaliação.

2.3.1. 1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]etil bis(1-pirazolil)metano (71) (C4)



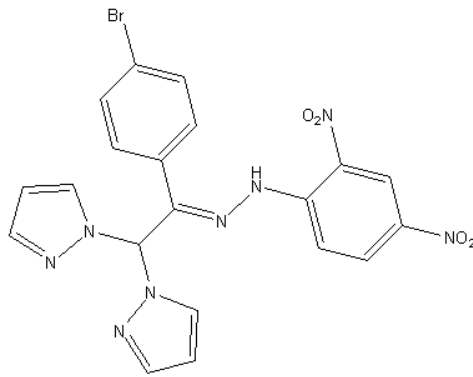
(71)

2.3.2. 1-[1-(p-Toluenosulfonilhidrazono)]etil bis(1-pirazolil)metano (72) (C7)



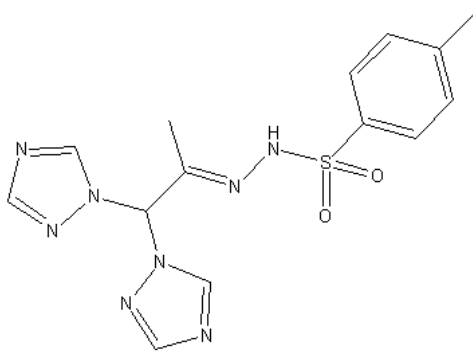
(72)

2.3.3. {4-bromofenil-1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]}etil bis(1-pirazolil)metano (73) (C5 e C6)



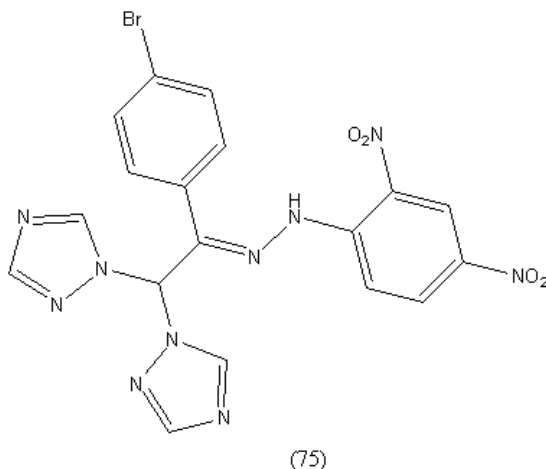
(73)

2.3.4. 1-[1-(p-Toluenosulfonilhidrazono)]etilbis[1-(1,2,4-triazolil)]metano (74) (C8)



(74)

2.3.5. {4-bromofenil-1-[1-(2,4-dinitrofenilhidrazono)]}etil bis[1-(1,2,4-triazolil)metano (75) (C9)



2.4. Atividade antifúngica

De modo a avaliar a atividade antifúngica dos compostos BIMs desenvolvidos no âmbito do presente trabalho, foi utilizado o método de Kirby-Bauer, de difusão em agar, de acordo os protocolos estabelecidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.⁽⁸⁸⁾⁽⁸⁹⁾ Em concordância com este método, inoculam-se os microrganismos na superfície das placas de Petri contendo meio de cultura, com o propósito de possibilitar o crescimento das espécies fúngicas selecionadas. Após a inoculação, aplicam-se discos de papel de filtro, aos quais se adicionam os BIMs previamente sintetizados. Durante o período de incubação, os compostos difundem-se para o agar, produzindo um gradiente de concentração. Na região ao redor dos discos, formam-se halos de inibição do crescimento microbiano, que conforme a sua dimensão, permitem determinar a suscetibilidade dos fungos aos compostos BIMs previamente sintetizados.⁽⁸⁹⁾

2.4.1. Fungos testados

As culturas dos microrganismos utilizadas neste estudo englobavam duas estirpes da espécie *Candida albicans* (ATCC 10231 e ATCC 90028), e as espécies *Cryptococcus neoformans* (YPO 186) e *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 3507). Suspensões das leveduras selecionadas foram preparadas em tubos de ensaio de 5 mL com solução salina (0,85 % NaCl) estéril, de forma a obter-se uma turvação 0,5 do padrão de McFarland (Biomerieux).

2.4.2. Meios de cultura e soluções de compostos

Os meios de cultura utilizados Yeast Malt Agar (HIMEDIA) e Mueller-Hinton (OXOID) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. O meio Mueller-Hinton, foi suplementado com 2% de glucose. A esterilização dos meios foi realizada a 121 °C, a uma pressão de 1 atm, durante 15 minutos em autoclave. Após a esterilização os meios foram distribuídos nas caixas de Petri até solidificarem. Posteriormente, os meios foram refrigerados e armazenados a 4 °C até à sua utilização.

As espécies *C. albicans* (ATCC 10231 e 90028) e *C. neoformans* (YPO 186) foram inoculadas no meio de cultura Mueller-Hinton, enquanto *S. cerevisiae* (PYCC 3507) foi inoculada no meio de cultura Yeast Malt Agar.

Foram preparadas soluções a partir dos compostos previamente sintetizados, com uma concentração de 5 mg/mL. Foram pesados 10 mg (0,01 g) de cada composto, diretamente em tubos eppendorf, os quais foram dissolvidos em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e adequadamente homogeneizados.

2.4.3. Método Kirby-Bauer

A inoculação das placas de Petri com os seus respetivos meios de cultura foi efetuada recorrendo a zaragoas estéreis, que contêm uma amostra das suspensões de leveduras preparadas, ao longo de 3 eixos de inoculação (Figura 2.1).



Figura 2. 1 Representação do padrão de inoculação de acordo com o método Kirby-Bauer [adaptado de (90)]

De seguida, cada uma das placas foi dividida em 2 e colocou-se assepticamente 1 disco de papel (6 mm de diâmetro) (Oxoid) em cada lado da placa. Sobre os discos, adicionou-se lentamente 20 μ L da solução do composto a testar (Figura 2.2).

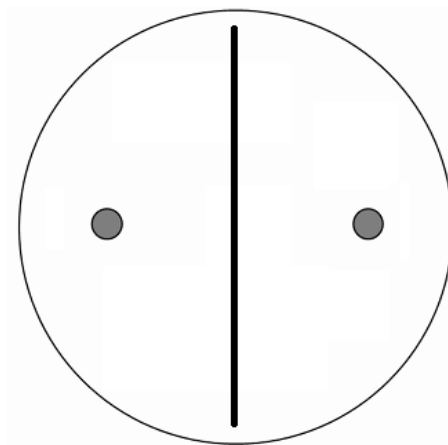


Figura 2. 2 Representação esquemática da placa de Petri após a aplicação dos discos [adaptado de (88)]

Preparou-se 2 placas onde se colocou os antimicóticos que corresponderam a controlos positivos: fluconazol (Flu), anfotericina b (Anf.B), nistatina (Nist) e o controlo negativo (DMSO). Numa das placas colocou-se um disco contendo fluconazol e outro com anfotericina B e na outra placa um disco com nistatina e um disco onde se aplicou DMSO.

As placas inoculadas foram incubadas a 30° C, durante 24 horas, e após este período, observou-se halos de inibição do crescimento microbiano. Registou-se o diâmetro dos mesmos (milímetros) e calculou-se as respectivas médias e desvios-padrão. Executou-se este ensaio três vezes.

3. Resultados e discussão

Os resultados das medições dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das leveduras em meio de cultura sólido na presença dos compostos em estudo na concentração 5 mg/ml (100 µg), encontram-se registados na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 Valores dos diâmetros médios e os correspondentes desvios-padrão (mm), dos halos de inibição do crescimento das leveduras resultantes da aplicação dos compostos sintetizados e de controlo. (-): ausência de halo; fluconazole (Flu); anfotericina B (Anf.B); nistatina (Nist) (Compostos em estudo [5 mg/ml (100 µg)])

	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	<i>C. neoformans</i> (YPO 186)	<i>S. cerevisiae</i> (PYCC 3507)
DMSO/NaCl	-	7,83 ± 1,29	-	8,91 ± 1,02
Flu. (25µg)	-	21,25 ± 7,31	20,67 ± 0,94	16,08 ± 1,07
Anf.B (10µg)	21,75 ± 4,31	18,33 ± 3,67	7,75 ± 6,01	9,33 ± 0,75
Nist. (10µg)	21,25 ± 8,35	11,75 ± 8,95	-	7,75 ± 12,01
C1 (100µg)	4,83 ± 3,75	7,50 ± 0,63	5,92 ± 4,63	6,42 ± 4,98
C2 (100µg)	5,50 ± 4,27	8,17 ± 0,82	5,67 ± 4,41	5,83 ± 4,91
C3 (100µg)	2,33 ± 3,61	6,58 ± 0,66	5,50 ± 4,28	8,67 ± 0,75
C4 (100µg)	2,42 ± 3,77	7,08 ± 1,28	5,33 ± 4,20	8,91 ± 0,80
C5 (100µg)	5,00 ± 3,90	8,91 ± 0,66	5,92 ± 4,59	9,75 ± 0,42
C6 (100µg)	2,25 ± 3,49	7,25 ± 1,04	6,08 ± 4,72	8,92 ± 1,32
C7 (100µg)	4,42 ± 3,51	6,58 ± 0,86	2,50 ± 3,89	8,08 ± 1,02
C8 (100µg)	2,67 ± 4,13	4,83 ± 3,80	5,83 ± 4,53	8,83 ± 0,75
C9 (100µg)	2,67 ± 4,13	8,17 ± 0,25	6,08 ± 4,72	8,92 ± 0,66
C10 (100µg)	8,25 ± 1,25	8,67 ± 0,88	6,67 ± 5,17	1,00 ± 0,31

A anfotericina B e a nistatina, como expectável, apresentaram a mais vasta capacidade inibitória, afetando todas as espécies de leveduras, com exceção da nistatina, que não teve qualquer efeito sobre *C. neoformans* (YPO 186). A consequente eficácia demonstrada pela anfotericina B pode dever-se ao seu duplo mecanismo de ação, destabilizado a membrana celular via a formação de poros transmembranas e produção de radicais livres.

O fluconazole demonstrou efeito em *C. albicans* (ATCC 90028), *C. neoformans* (YPO 186) e *S. cerevisiae* (PYCC 3507). Uma vez que este agente demonstra capacidade de inibir a estirpe (ATCC 90028) da espécie de *Candida* e *Cryptococcus*, extrapola-se que estirpe

C. albicans (ATCC 10231) deve manifestar mecanismos de resistência que não a torna suscetível a este composto azólico.

Os resultados da ação dos compostos sintetizados não foram significativos, uma vez que se encontravam no intervalo dos valores do controlo negativo (DMSO). No entanto, após a análise dos valores, no que se refere à estirpe *C. albicans* (ATCC 10231), pode-se inferir que os BIMs C1-3 e C10, embora com zonas de inibição diminutas, demonstraram uma eficácia superior aos bispira- (C4-C7) e triazolilmetanos (C8 e C9) e, quando comparados entre si, C10 regista um valor bastante mais elevado, quase o dobro, do que os outros BIMs (C1-3), deduzindo-se que a presença de um grupo oxima poderá beneficiar na inibição quando comparado com o grupo hidrazona.

Para espécie *S. cerevisiae*, a ação inibitória revelada foi o oposto do que se evidenciou para *C. albicans* (ATCC 10231), onde a ação da oxima presente no composto C10 foi bastante inferior às hidrazonas (C1-C4).

No caso de *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. neoformans* (YPO 186), os valores não divergem muito entre si, no entanto surgem algumas exceções. A atividade de C7 sobre *C. neoformans*, que exhibe valor mais baixo, quando comparado com C3 e C8, igualmente portadores do grupo toluenosulfonilhidrazono, que estão associados a valores ligeiramente maiores, deduz-se que a presença da função bis(1-pirazolil)metano compromete a atividade contra o fungo em causa. Relativamente ao composto C8, demonstrou o valor mais baixo de halo de inibição quando testado nas placas com *C. albicans* (ATCC 90028), sugerindo, tendo em conta que juntamente com os outros compostos que exibem o grupo toluenosulfonilhidrazono (C3 e C7) compõem os compostos com menor capacidade de inibição contra este fungo, que a adicional presença de triazolil poderá enfraquecer a sua capacidade inibição.

4. Conclusão e perspectivas futuras

Os compostos bisindólicos, como mencionados anteriormente, exibem uma ampla atividade terapêutica contra diversas patologias, notavelmente no tratamento oncológico. Estudos focados nestes compostos propõem principalmente alargar o seu espectro de atividade, incluindo determinar o seu potencial efeito como agente antimicótico.

Perante os resultados obtidos, os valores dos halos de inibição referentes aos compostos estudados – BIMs por nós sintetizados e bispirazoles e triazoles postos à nossa disposição - não se verificaram significativos.

No entanto, relativamente aos BIMs, os resultados poderão sugerir que futuras modificações estruturais deveriam manter a base oxima, e não a funcionalidade hidrazona (particularmente toluenosulfonilo), explorando subsequentemente outras possibilidades de substituição, com outros compostos heterocíclicos (azoles, tioazoles, etc) noutras posições da molécula.

Em trabalhos futuros, seria recomendável recorrer a outro método para avaliar a atividade antimicrobiana, optando por meios de cultura líquidos para determinar o efeito dos compostos nas leveduras. O método de Kirby-Bauer aplicado encontra-se limitado pela dificuldade de regular a concentração de microrganismos na suspensão celular (padrões de McFarland) e de atingir uma dispersão uniforme da colónia na inoculação das placas de Petri, que complica a posterior leitura dos resultados. Seria também relevante investigar o efeito em outras espécies de fungos (p.ex dermatófitos) com características morfológicas dissemelhantes e espécies de *Aspergillus*, visto que têm tido uma maior preponderância nas infeções causadas por agentes oportunistas.

Referências bibliográficas

1. Saldívar-González FI, Pilon-Jiménez BA, Medina-Franco JL. Chemical space of naturally occurring compounds. *Phys Sci Rev.* 2018;20180103. DOI:10.1515/psr-2018-0103.
2. Brahmachari G, Kumar D, Mishra BB, Kushwaha D, Tiwari VK, Banik BK, et al. *Chemistry and pharmacology of naturally occurring bioactive compounds.* Boca Raton: CRC Press; 2013.
3. Biswal S, Sahoo U, Sethy S, Kumar HKS, Banerjee M. Indole: The molecule of diverse biological activities. *Asian J Pharm Clin Res.* 2012;5(1):1-6.
4. Dhuguru J, Skouta R. Role of indole scaffolds as pharmacophores in the development of anti-lung cancer agents. *Molecules.* 2020;25(7). DOI:10.3390/molecules25071615.
5. Dadashpour S, Emami S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. *Eur J Med Chem.* 2018;150:9-29.
6. Kaushik NK, Kaushik N, Attri P, Kumar N, Kim CH, Verma AK, Choi EH. Biomedical importance of indoles. *Molecules.* 2013;18(6):6620-62. DOI:10.3390/molecules18066620.
7. Zhang MZ, Chen Q, Yang GF. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *Eur J Med Chem.* 2015;89:421-41. DOI:10.1016/j.ejmech.2014.10.065.
8. Ciulla MG, Kumar K. The natural and synthetic indole weaponry against bacteria. *Tetrahedron Lett.* 2018;59(34):3223-33. DOI:10.1016/j.tetlet.2018.07.045.
9. Praveen PJ, Parameswaran PS, Majik MS. Bis(indolyl)methane alkaloids: Isolation, bioactivity, and syntheses. *Synthesis (Stuttg).* 2015;47(13):1827-37. DOI:10.1055/s-0034-1380415.
10. Imran S, Taha M, Ismail NH. A review of bisindolylmethane as an important scaffold for drug discovery. *Curr Med Chem.* 2015;22.DOI: 10.2174/0929867322666151006093930.
11. Marrelli M, Cachet X, Conforti F, Sirianni R, Chimento A, Pezzi V, et al. Synthesis of a new bis(indolyl)methane that inhibits growth and induces apoptosis in human prostate cancer cells. *Nat Prod Res.* 2013;27(21):2039-45. DOI:10.1080/14786419.2013.824440.
12. Grosso C, Cardoso AL, Lemos A, Varela J, Rodrigues MJ, Custódio L, et al. Novel approach to bis(indolyl)methanes: De novo synthesis of 1-hydroxyiminomethyl derivatives with anti-cancer properties. *Eur J Med Chem.* 2015;93:9-15. DOI:10.1016/j.ejmech.2015.01.050.
13. Imran S, Taha M, Ismail NH, Khan KM, Naz F, Hussain M, et al. Synthesis of novel bisindolylmethane Schiff bases and their antibacterial activity. *Molecules.* 2014;19(8):11722-40. DOI:10.3390/molecules190811722.

14. Jiang Y, Su L, Liao Y, Shen Y, Gao H, Zhang Y, et al. Synthesis and antifungal evaluation of phenol-derived bis(indolyl)methanes combined with FLC against *Candida albicans*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2022;58:128525. DOI:10.1016/j.bmcl.2022.128525.
15. Li Y, Kong D, Ahmad A, Bao B, Sarkar FH. Antioxidant function of isoflavone and 3,3'-diindolylmethane: Are they important for cancer prevention and therapy? *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(2):139-50. DOI:10.1089/ars.2013.5233.
16. Bharate SB, Bharate JB, Khan SI, Tekwani BL, Jacob MR, Mudududdla R, et al. Discovery of 3,3'-diindolylmethanes as potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem*. 2013;63:435-43. DOI:10.1016/j.ejmech.2013.02.024.
17. Shiri M, Zolfigol MA, Kruger HG, Tanbakouchian Z. Bis- and trisindolylmethanes (BIMs and TIMs). *Chem Rev*. 2010;110(4):2250-93. DOI:10.1021/cr900195a.
18. Kaishap PP, Dohutia C. Synthetic approaches for bis(indolyl)methanes. *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4(4):1312-22. DOI: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(4\).1312-22](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(4).1312-22)
19. Grosso C, Cardoso AL, Rodrigues MJ, Marques C, Barreira L, Lemos A, Pinho e Melo TMDV. Hetero-Diels-Alder approach to Bis(indolyl)methanes. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(3):1122-31. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.12.028.
20. Gong H, Xie Z. Research progress of synthesis of bis(indolyl)methanes. *Chin J Org Chem*. 2012;32(7):1195-207. DOI: 10.6023/CJOC1110263.
21. Lee SO, Choi J, Kook S, Lee SY. Lewis acid-catalyzed double addition of indoles to ketones: Synthesis of bis(indolyl)methanes with all-carbon quaternary centers. *Org Biomol Chem*. 2020;18(44):9060-4. DOI: 10.1039/d0ob01916j.
22. Indurthi HK, Viridi R, Koli P, Nageswara Rao D, Sharma DK. Seralite SRC-120 resin catalyzed synthesis of bis(indolyl)methanes using indoles and low/high boiling point carbonyl compounds under solvent free conditions. *Synth Commun*. 2021;51(1):139-50. DOI: 10.1080/00397911.2020.1849724.
23. Surasani R, Kalita D, Chandrasekhar KB. Indion Ina 225H resin as a novel, selective, recyclable, eco-benign heterogeneous catalyst for the synthesis of bis(indolyl)methanes. *Green Chem Lett Rev*. 2013;6(2):113-22. DOI: 10.1080/17518253.2012.711372.
24. Handy S, Westbrook NM. A mild synthesis of bis(indolyl)methanes using a deep eutectic solvent. *Tetrahedron Lett*. 2014;55(35):4969-71. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.07.024.
25. Grosso C, Brigas A, de los Santos JM, Palacios F, Lemos A, Pinho e Melo TMDV. Natural deep eutectic solvents in the hetero-Diels-Alder approach to bis(indolyl)methanes. *Monatsh Chem*. 2019;150(7):1275-88. DOI: 10.1007/s00706-019-02421-7.

26. Qiang W, Liu X, Loh TP. Supported iridium catalyst for the green synthesis of 3,3'-bis(indolyl)methanes using methanol as the bridging methylene source. *ACS Sustain Chem Eng.* 2019;7(9):8429-39. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b00094.
27. Pal R, Khannobis S, Sarkar T. First application of fruit juice of *Citrus limon* for facile and green synthesis of bis- and tris(indolyl)methanes in water. *Chem J.* 2013;3(1):7-12. Disponível em: www.scientific-journals.co.uk.
28. Pal R. New greener alternative for biocondensation of aldehydes and indoles using lemon juice: Formation of bis-, tris-, and tetraindoles. *Int J Org Chem.* 2013;3(2):136-42. DOI: 10.4236/ijoc.2013.32015.
29. Pindur U, Lutz G, Otto C. Acceleration and selectivity enhancement of Diels-Alder reactions by special and catalytic methods. *Chem Rev.* 1999;93:741-701.
30. Sarmah D, Bora U. Methylene surrogates for the synthesis of 3,3'-diindolylmethanes. *ChemistrySelect.* 2020;5(28):8577-8603. DOI:10.1002/slct.202001694.
31. Cardoso AL, Lopes SMM, Grosso C, Pineiro M, Lemos A, Pinho E Melo TMVD. One-pot synthetic approach to dipyrromethanes and bis(indolyl)methanes via nitrosoalkene chemistry. *J Chem Educ.* 2021;98(8):2661-2666. DOI:10.1021/acs.jchemed.1c00184.
32. Singh Gujral S, Popli A. Introduction to Diels Alder reaction, its mechanism and recent advantages: a review. *Indo Am J Pharm Res.* 2013. Disponível em: <http://www.iajpr.com/index.php/en>
33. Torres P, Balcells M, Canela-Garayoa R. Effect of novel deep eutectic solvents on the endo/exo ratio of Diels-Alder reactions at room temperature. *ACS Omega.* 2021;6(30):19392-9. DOI:10.1021/acsomega.1c00980.
34. Ishihara K, Sakakura A. Hetero-Diels-Alder reactions. In: *Comprehensive Organic Synthesis: Second Edition.* Vol. 5. Elsevier Ltd.; 2014. p. 409-65. DOI:10.1016/B978-0-08-097742-3.00510-3.
35. Grosso C, Liber M, Brigas AF, Pinho e Melo TMVD, Lemos A. Regioselectivity in hetero Diels-Alder reactions. *J Chem Educ.* 2019;96(1):148-52. DOI:10.1021/acs.jchemed.7b00933.
36. Kobayashi S, Jørgensen KA, editors. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis.* Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH; 2001. ISBN: 3-527-30159-3
37. Oliveira BL, Guo Z, Bernardes GJL. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev.* 2017;46(16):4895-950. DOI:10.1039/c7cs00184c.
38. Arrieta A, Cossío FP, Lecea B. Direct evaluation of secondary orbital interactions in the Diels-Alder reaction between cyclopentadiene and maleic anhydride. *J Org Chem.* 2001;66(18):6178-80. DOI:10.1021/jo0158478.

39. Mccarrick MA, Wu YD, Houk KN. Hetero-Diels-Alder reaction transition structures: reactivity, stereoselectivity, catalysis, solvent effects, and the exo-lone-pair effect. *J Org Chem.* 1993;58:3330-43. DOI: 10.1021/jo00064a020.
40. Lopes SMM, Cardoso AL, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. Recent advances in the chemistry of conjugated nitrosoalkenes and azoalkenes. *Chem Rev.* 2018;118(23):11324-52. DOI:10.1021/acs.chemrev.8b00375.
41. Pereira NAM, Lopes SMM, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. On-water synthesis of dipyrromethanes via bis-hetero-Diels-Alder reaction of azo- and nitrosoalkenes with pyrrole. *Synlett.* 2014;25(3):423-7. DOI:10.1055/s-0033-1340300.
42. Lemos A. Cycloaddition reactions of conjugated azoalkenes. In: *Chemical Reviews*. CIQA, Departamento de Química e Farmácia, FCT, Universidade do Algarve; 2018.
43. Rai KML. Heterocycles via oxime cycloadditions. In: *Synthesis of heterocycles via cycloadditions II*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 1-69. DOI:10.1007/7081_2008_112.
44. Faragher R, Gilchrist TL. Cycloaddition reactions of nitrosoalkenes and azoalkenes with cyclopentadiene and other dienes. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 1979;(0):249-257. DOI:10.1039/P19790000249.
45. Belskaya NP, Eliseeva AI, Bakulev VA. Hydrazones as substrates for cycloaddition reactions. *Russ Chem Rev.* 2015;84(12):1226-57. DOI:10.1070/RCR4463.
46. Sukhorukov AY, Ioffe SL. Chemistry of six-membered cyclic oxime ethers: Application in the synthesis of bioactive compounds. *Chem Rev.* 2011;111(8):5004-41. DOI:10.1021/cr100292w.
47. 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.* 2002;(11):274-92. DOI:10.3998/ark.5550190.0003.b25.
48. Boyko YD, Dorokhov VS, Sukhorukov AY, Ioffe SL. Conjugated nitrosoalkenes as Michael acceptors in carbon-carbon bond forming reactions: A review and perspective. *Beilstein J Org Chem.* 2017;13:2214-34. DOI:10.3762/bjoc.13.220.
49. Lyapkalo IM, Ioffe SL. Conjugated nitrosoalkenes. *Russ Chem Rev.* 1998; 67 (6) 467-84. DOI: 10.1070/RC1998v067n06ABEH000406.
50. Gilchrist TL. Nitroso-alkenes and nitroso-alkynes. *Chem Soc Rev.* 1983;12(1):53-66. DOI: 10.1039/CS9831200053.

51. Shen LW, Li TT, You Y, Zhao JQ, Wang ZH, Yuan WC. Inverse Electron-Demand Aza-Diels-Alder Reaction of Cyclic Enamides with 1,2-Diaza-1,3-dienes in Situ Generated from α -Halogeno Hydrazones: Access to Fused Polycyclic Tetrahydropyridazine Derivatives. *J Org Chem*. 2021;86(17):11472-81. DOI:10.1021/acs.joc.1c00993.
52. Diels O, Alder K. Synthesen in der hydroaromatischen Reihe, IV. Mitteilung: Über die Anlagerung von Maleinsäure-anhydrid an arylierte Diene, Triene und Fulvene. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1929;473:2081-2100.
53. Houk KN, Liu F, Yang Z, Seeman JI. Evolution of the Diels–Alder reaction mechanism since the 1930s: Woodward, Houk with Woodward, and the influence of computational chemistry on understanding cycloadditions. *Angew Chem Int Ed*. 2021;60(23):12660–81. DOI:10.1002/anie.202001654.
54. Clarke SJ, Gilchrist TL, Lemos A, Roberts TG. Reactions of azoalkenes derived from hydrazones of ethyl bromopyruvate with electron rich alkenes and heterocycles. *Tetrahedron*. 1991;47(29). DOI:10.1016/s0040-4020(01)80992-3.
55. Lopes SMM, Nunes SCC, Caratão CC, Pais AACC, Pinho e Melo TMVD. Reactivity of 1-arylnitrosoethylenes towards indole derivatives. *Monatshefte Fur Chem*. 2016;147(9):1565-1573. DOI:10.1007/s00706-016-1763-1.
56. Wei L, Wang CJ. The catalytic asymmetric synthesis of tetrahydropyridazines via inverse electron-demand aza-Diels-Alder reaction of enol ethers with azoalkenes. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(84):15374-15377. DOI:10.1039/c5cc06465a.
57. Tong MC, Chen X, Li J, Huang R, Tao H, Wang CJ. Catalytic asymmetric synthesis of [2,3]-fused indoline heterocycles through inverse-electron-demand aza-Diels-Alder reaction of indoles with azoalkenes. *Angew Chem Int Ed*. 2014;53(18):4680-4684. DOI:10.1002/anie.201400109.
58. Lopes SMM, Palacios F, Lemos A, Pinho E Melo TMVD. Diels-Alder reactions of 3-(1H-tetrazol-5-yl)-nitrosoalkenes: Synthesis of functionalized 5-(substituted)-1H-tetrazoles. *Tetrahedron*. 2011;67(46):8902–9. DOI:10.1016/j.tet.2011.09.051.
59. Panice MR, Lopes SMM, Figueiredo MC, Goes Ruiz ALT, Foglio MA, Nazari Formagio AS, Sarragiotto MH, Pinho e Melo TMVD. New 3-tetrazolyl- β -carbolines and β -carboline-3-carboxylates with anti-cancer activity. *Eur J Med Chem*. 2019;179:123–32. DOI:10.1016/j.ejmech.2019.05.085.
60. Lopes SMM, Brigas AF, Palacios F, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. [4+2] Cycloadditions of 3-tetrazolyl-1,2-diaza-1,3-butadienes: Synthesis of 3-tetrazolyl-1,4,5,6-tetrahydropyridazines. *Eur J Org Chem*. 2012;2012(11):2152–60. DOI:10.1002/ejoc.201101826.

61. Lopes SMM, Lemos A, Melo TMVDP. A hetero-Diels-Alder approach to functionalized 1H-tetrazoles: Synthesis of tetrazolyl-1,2-oxazines, -oximes and 5-(1-aminoalkyl)-1H-tetrazoles. *Tetrahedron Lett.* 2010;51(51):6756–9. DOI:10.1016/j.tetlet.2010.10.095.
62. Webster J, Weber R. *Introduction to Fungi*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2012.
63. Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
64. Kibbler CC, Barton NR, Howell D, Manuel R. *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford Textbooks in Infectious Disease and Microbiology. Bell & Bain Ltd.: Oxford University Press; 2018.
65. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiol Spectr.* 2017;5(5). DOI:10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016.
66. Watkinson SC, Boddy L, Money NP, editors. *The fungi*. 3rd ed. Academic Press; 2016.
67. Richardson JP. *Candida albicans*: a major fungal pathogen of humans. *Pathogens.* 2022;11(4) 459. DOI:10.3390/pathogens11040459
68. Fan FM, Liu Y, Liu YQ, Lv RX, Sun W, Ding WJ, Cai YX, Li WW, Liu X, Qu W. *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. *Int J Antimicrob Agents.* 2022;60(5-6):106688.
69. Costa-De-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Gonçalves Rodrigues A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(5):365-74. DOI:10.1007/s10096-007-0448-4.
70. Veríssimo C, Sabino R, Martins C, Brandão J. Infecção fúngica em Portugal - O gigante adormecido. 2(1). 2016; 20-27.
71. Sabino R, Veríssimo C, Brandão J, Martins C, Alves D, Pais C, Denning DW. Serious fungal infections in Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(7):1345-1352. DOI:10.1007/s10096-017-2930-y.
72. Rato M, Costin A, Furtado C, Sousa C, Toscano C, Veríssimo C, Trindade F, Tavares Almeida F, da Cunha Velho G, Catorze G, Raposo I, Selada J, Ferreira JA, Batista J, Santos L, Sereijo M, Silva M, Apetato M, Sanches M, Anes M. Epidemiologia das infeções fúngicas superficiais em Portugal - revisão de 3 anos (2014-2016). *J Port Soc Dermatol Venereol.* 2018;76(3):269-278. DOI:10.29021/spdv.76.3.910.
73. Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW. *Identification of Pathogenic Fungi*. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2013.

74. Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):401–16. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.01.013.
75. Enache-Angoulvant A, Hennequin C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin Infect Dis.* 2005;41(11):1559–67. DOI: 10.1086/497832
76. Pérez-Torrado R, Querol A. Opportunistic strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential risk sold in food products. *Front Microbiol.* 2016;6:1522. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01522.
77. Iyalla C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi. *Afr J Clin Exp Microbiol.* 2016;18(1):53. DOI: 10.4314/ajcem.v18i1.8.
78. Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol.* 2016;32:89–95. DOI: 10.1016/j.mib.2016.05.010.
79. Howard KC, Dennis EK, Watt DS, Garneau-Tsodikova S. A comprehensive overview of the medicinal chemistry of antifungal drugs: perspectives and promise. *Chem Soc Rev.* 2020;49(8):2426–80. DOI: 10.1039/c9cs00556k.
80. Mani Chandrika KVS, Sharma S. Promising antifungal agents: a minireview. *Bioorg Med Chem.* 2020;28(7):115398. DOI:10.1016/j.bmc.2020.115398.
81. Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol. 892. New York: Springer; 2016. p. 327–49. DOI:10.1007/978-3-319-25304-6_14.
82. Vanreppelen, G., Wuyts, J., van Dijck, P., & Vandecruys, P. (2023). Sources of Antifungal Drugs. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 2). MDPI. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof9020171>
83. Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5). DOI:10.1128/microbiolspec.funk-0002-2016.
84. Rabaan AA, Sulaiman T, Al-Ahmed SH, Buhaliqah ZA, Buhaliqah AA, AlYuosof B, et al. Potential strategies to control the risk of antifungal resistance in humans: A comprehensive review. *Antibiotics.* 2023;12(3):608. DOI:10.3390/antibiotics12030608.
85. Teixeira MM, Carvalho DT, Sousa E, Pinto E. New antifungal agents with azole moieties. *Pharmaceuticals.* 2022;15(11). DOI:10.3390/ph15111427.
86. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R, et al. The antifungal pipeline: Fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim, opelconazole, and rezafungin. *Drugs.* 2021;81(15):1703-29. DOI:10.1007/s40265-021-01611-0.

87. Van Daele R, Spriet I, Wauters J, Maertens J, Mercier T, Van Hecke S, Brüggemann R. Antifungal drugs: What brings the future? *Med Mycol.* 2019;57:S328–S343. DOI:10.1093/mmy/myz012.
88. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology; 2016. Disponível em: <https://www.asmscience.org>
89. Biemer JJ. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Ann Clin Lab Sci.* 1973;3(2):135-144.
90. Katz DS, Leyva K. Modifying the Kirby-Bauer antibiotic susceptibility exercise to promote active learning. *MicrobeLibrary* [Internet]. 2007 Dec 19 [cited 2024 Sep 21]. Disponível em: <https://asm.org/lesson-plans/modifying-the-kirby-bauer-antibiotic-susceptibilit>