



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016004654-8 A2

(22) Data do Depósito: 02/03/2016

(43) Data da Publicação: 05/09/2017



* B R 1 0 2 0 1 6 0 0 4 6 5 4 A

(54) Título: UTILIZAÇÃO DE TIOSSEMICARBAZIDA E DO DERIVADO TIOSSEMICARBAZIDA CANFENO NO TRATAMENTO DE MICOSES

(51) Int. Cl.: C07C 337/06; A61K 31/17; A61P 31/10

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

(72) Inventor(es): LÍVIA DO CARMO SILVA; CLEUZA CONCEIÇÃO DA SILVA; CECILIA MARIA ALVES DE OLIVEIRA; CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES; JULIANA ALVES PARENTE ROCHA; ALEXANDRE MELO BAILÃO; JOYCE VILLA VERDE BASTOS BORBA; MARISTELA PEREIRA

(57) Resumo: A presente patente se refere a um novo composto fármaco, que o mesmo apresenta alta capacidade inibitória do crescimento de Paracoccidioides sp. agindo sobre a atividade enzimática de superóxido dismutase, enzima importante no processo de detoxificação, desestabilização do potencial mitocondrial, inibição do ciclo celular e indução de espécies reativas de oxigênio. Essa nova descoberta, aliada ao fato de TSC-C ser um composto com características importantes para um protótipo de fármaco, com baixíssima citotoxicidade, visa à construção de antifúngicos mais específicos e conseqüentemente mais efetivos e com menores efeitos colaterais aos pacientes.

UTILIZAÇÃO DE TIOSSEMICARBAZIDA E DO DERIVADO TIOSSEMICARBAZIDA CANFENO NO TRATAMENTO DE MICOSES

[001] A presente invenção relata a indicação de TSC e TSC-C a protótipos de fármaco. Os estudos realizados em *Paracoccidioides* sp. na presença de TSC e TSC-C permitem concluir que o fungo está respondendo aos compostos alterando a expressão de genes, com o propósito de diminuir o estresse oxidativo e seus efeitos na desestabilização dos processos relacionados à mitocôndria e conseqüente homeostase celular. Esse estudo auxilia na compreensão do modo de ação destes compostos, os quais possuem baixa toxicidade e se mostraram eficientes na inibição do crescimento e viabilidade de *Paracoccidioides*. Para tal, foram realizados testes como a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos, avaliação da citotoxicidade, sensibilidade em placa, ensaios enzimáticos, análise do ciclo celular, potencial da membrana mitocondrial, verificação de formação de espécies reativas de oxigênio e ensaios de inibição da transição micélio levedura.

[002] O fungo patogênico *Paracoccidioides* spp., descrito por Adolfo Lutz em 1908, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica que afeta humanos, caracterizada como uma infecção granulomatosa e crônica, sendo geograficamente restrita aos países da América Latina (Shikanai-Yasuda et al.; 2006). *Paracoccidioides* spp. apresentam termodimorfismo, crescendo na forma miceliana em condições saprófitas ou quando cultivado à temperatura ambiente (18-23°C) e na forma leveduriforme nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado à 36°C (Restrepo et al., 1985; Brummer et al., 1993; Bagagli et al., 2006). Além da temperatura, outro estímulo capaz de bloquear esta transição é o hormônio 17- β -estradiol (Salazar et al., 1998) modulando a expressão de genes pertencentes à categorias funcionais, tais como resposta ao choque térmico, manutenção e remodelação da parede celular, metabolismo energético, sinalização celular e fatores de virulência (Shankar et al., 2011).

[003] O processo de transição morfológica de *Paracoccidioides* spp. é foco de várias análises transcricionais, sendo caracterizado pela indução de genes relacionados à remodelação da parede celular e membrana, metabolismo e fatores de virulência que são potenciais candidatos a alvos para novos fármacos (Felipe et al., 2005; Costa et al., 2007; Bastos et al., 2007; Parente et al., 2008).

[004] Morfologicamente, *Paracoccidioides* spp. assumem a forma leveduriforme no hospedeiro, definida como fase parasitária, e a forma de micélio no ambiente, fase infecciosa (Bagagli et al., 2006). As células leveduriformes, no aspecto microscópico, são multinucleadas, arredondadas, com brotamentos múltiplos e parede celular dupla. A forma miceliana apresenta uma organização pluricelular formada por filamentos de células, as hifas, que são finas, septadas, podendo apresentar esporos terminais. Células com blastoconídios simples ou múltiplos, gerados por germinação conferem ao fungo a característica primordial em sua identificação: o aspecto de “roda de leme” (Restrepo et al., 1989; Brummer et al. 1993).

[005] A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose que manifesta comumente como uma pneumopatologia de curso crônico, associada a lesões da mucosa e pele, podendo disseminar através da corrente sanguínea ou linfática acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (Valera et al., 2008; Silva-Vergara et al., 2014; Barbosa et al., 2014). Em indivíduos com resposta imunológica satisfatória, o desenvolvimento da infecção pode ser contido, não havendo nenhuma manifestação. Porém o fungo é capaz de permanecer no hospedeiro, em estado latente e após um período, progredir e dar origem as formas crônicas no adulto. Menos frequente, a doença pode progredir já do foco primário originando a forma aguda-subaguda na infância e adolescência (Londero 1986, Grossklaus et al., 2009). A inalação de conídios e fragmentos de micélios, formas infectantes do fungo, é a frequente via de infecção (McEwen et al., 1987; Brummer et al., 1993; San Blas et al., 2002).

[006] Nos pulmões, sob efeitos da temperatura corpórea do hospedeiro, uma série de proteínas são ativadas, conduzindo a uma reorganização metabólica, o que permite a transformação da forma infectante para parasitária (Borges-Walmsley et al., 2002; Rezende et al., 2011; Borges et al. 2011).

[007] A PCM tem caráter incapacitante e com alta taxa de mortes prematuras, o que faz dela um problema de saúde pública, de grande repercussão socioeconômica (Mendes et al., 2003; Shikanai-Yasuda et al., 2006). O maior número de casos ocorre principalmente em indivíduos entre 30 a 50 anos de idade, do sexo masculino (Londero & Ramos 1990; Blotta et al., 1999; Marques et al., 2007) e trabalhadores rurais residentes em áreas endêmicas está em contato direto com a terra e vegetais, inalando aerossóis contendo conídios fúngicos (Franco et al., 2000; Shikanai-Yassuda et al., 2006).

[008] Acredita-se que a incidência anual de PCM em áreas rurais endêmicas varia entre 1-3 novos casos/100.000 habitantes, sendo considerada a terceira maior causa de morte por doença infecciosa crônica, sendo a taxa de mortalidade por PCM é de 1,65 casos / população 1.000.000 (Shikanai-Yasuda et al., 2006). O Brasil é responsável pela maioria dos casos de PCM descritos na literatura. De 1980 a 1999 foi evidenciado no estado de Mato Grosso do Sul 422 casos (Paniago et al., 2003). Em Goiás no período de 2000 a 2006 foram diagnosticados 77 casos de PCM (Ferreira et al., 2012), no Paraná de 1980 a 1998 foram reportadas 551 mortes por PCM e 102 casos de 2008 a 2009 (Bittencourt et al., 2005; Loth et al., 2011), em São Paulo 1000 casos foram descritos de 1960 a 1999 (Bellissimo et al., 2011). Esta análise é relevante para entender a real situação da PCM no Brasil, pois não há notificação obrigatória dos pacientes diagnosticados com esta micose no sistema oficial de saúde (Martinez 2010).

[009] A problemática do tratamento da PCM está na toxicidade, custo e o tempo do tratamento. Apesar de eficazes, os fármacos disponíveis apresentam vários efeitos adversos, além de serem prescritos por meses e anos, ocasionando frequente desistência dos pacientes (Marques 2003, Hahn et al., 2003).

[010] O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado, como do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. A regressão das alterações clínicas é observada entre um e seis meses após o início do tratamento. A erradicação do fungo nos tecidos é lenta, sendo necessária a avaliação periódica dos pacientes quanto aos sintomas e desaparecimento das lesões ativas, para evitar reincidivas (Araújo et al., 2009).

[011] O tratamento contra a PCM é realizado com administração de anfotericina B, sulfonamidas e antifúngicos da classe dos azólicos, tais como cetoconazol, itraconazol e fluconazol (Yasuda et al., 2006; Travassos et al., 2008). Além dos antifúngicos, o suporte nutricional, tratamento de eventuais sequelas e a prevenção de doenças oportunistas devem ser consideradas no paciente (Yasuda et al., 2006; Ramos-e-Silva & Saraiva 2008; Fiol et al., 2013).

[012] A PCM é classificada em forma aguda e subaguda (tipo juvenil) predominante em pessoas jovens de ambos os sexos e forma crônica (tipo adulta) predominante em indivíduos adultos (Franco et al., 1987; Marques 2003). A forma aguda ou subaguda pode ser moderada ou severa, destacando a presença de linfonodomegalias superficiais e profundas, hepatoesplenomegalia, anemia, febre e emagrecimento. A forma crônica pode ser uni ou multifocal dependendo da evolução e da localização das lesões; apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas com lesões predominantes no pulmão e mucosa orofaríngea, podendo também causar lesões granulomatosas no sistema nervoso central (Almeida et al., 2004; Yasuda et al., 2006; Ramos e Silva et al. 2008; Queiros-Telles et al. 2011).

[013] É fato que vários problemas relacionados aos antifúngicos atuais têm sido evidenciados, principalmente no que diz respeito à toxicidade. Apesar da existência de potentes agentes antifúngicos, isolados resistentes ou multi-resistentes continuam surgindo (Hahn et al., 2003; Lelièvre et al., 2013). Em *Paracoccidioides* spp., foram encontrados homólogos para CDR1, CDR2 e MDR1 de *Candida albicans*, PDR5 de *Saccharomyces cerevisiae* e o genes *AtrF* de *Aspergillus* spp., todos eles relacionados com a resistência a azóis.

[014] Assim, como o tratamento atual para PCM utiliza principalmente derivados azólicos, esses genes podem desempenhar um papel similar em *Paracoccidioides* spp., com possibilidade do surgimento de isolado resistente (Costa et al., 2005), tornando-se necessária a busca permanente por novos candidatos a antifúngicos e consequente pesquisa por novas substâncias bioativas.

[015] Nesse sentido, nosso grupo tem investido esforços na identificação e caracterização de novos alvos para drogas antifúngicas em *Paracoccidioides* spp. bem como na busca de novos compostos antifúngicos obtidos de fontes naturais ou através de síntese química (Zambuzzi et al., 2013; Santana et al., 2012; Tomazett et al., 2010). Entre os compostos sob investigação está oenoteína B, obtido da planta *Eugenia uniflora*, o qual apresenta efeito antiproliferativo em *Paracoccidioides* spp., inibindo a expressão do transcrito de 1,3- β -glicana sintase e induzindo alterações morfológicas no fungo (Zambuzzi et al., 2013). A descoberta ou síntese de uma molécula com potencial ativo e a sua correlação com o alvo biológico apropriado constitui o início do processo de pesquisa e desenvolvimento racional de fármacos. Assim, técnicas genômicas estão sendo aplicadas a fungos com o objetivo de obter uma visão integrada da biologia e de extrair alvos adequados para a descoberta de drogas.

[016] O emprego de pequenas moléculas de origem natural como fármacos ou como protótipos de fármacos é um tema bem estabelecido no desenvolvimento de novos medicamentos (Wilson & Danishefsky 2006). O sucesso desta estratégia reside na especialização inerente à evolução bioquímica dos metabólitos secundários, resultado de um longo processo de seleção natural para fins biológicos. Assim, características como seletividade, potência e farmacocinética, entre outros, colocam os produtos naturais e seus derivados em posição de vantagem quando do desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, para que um fármaco derivado de bioproduto seja inserido na cadeia produtiva, o produto natural deve ser facilmente disponível por método

extrativo ou facilmente preparado. Neste contexto, os terpenos assumem papel de destaque devido à sua disponibilidade no mercado nacional (Silva Santos et al., 2006). Apesar destes aspectos, o emprego de terpenos no desenvolvimento de fármacos ainda é ténue.

[017] As tiossemicarbazidas (TSC) são moléculas importantes na síntese orgânica, por serem facilmente modificáveis e podem sofrer modificações estruturais levando a diferentes compostos para várias aplicações. TSCs são obtidas pela reação entre isotiocinatos e hidrazinas (Sousa-Pereira et al., 2013) e muitos derivados tem demonstrado atividades biológicas como anticonvulsivantes (Nevagi et al., 2014), antimicrobianos (Siwek, 2011), antitumorais (Serra et al., 2014), anti-tuberculose (Patel et al., 2014), antiparasitários (Dzitko et al., 2014) e antioxidantes (El-Gammal & Mostafa, 2014). Monoterpenóides também são moléculas muito significantes obtidas de óleos essenciais de plantas que possuem um grande espectro de propriedades biológicas. Esses componentes são bons materiais de partida na síntese orgânica pois eles podem ser produzidos em larga escala como enantiômeros puros e eles também tem grupos funcionais importantes que podem ser quimicamente modificáveis. O canfeno é um monoterpene, produto natural extraído da espécie *Cinnamomum camphora*, popularmente conhecida como cânfora. A tiossemicarbazida é obtida a partir do produto natural canfeno, um derivado terpeno sintético. O derivado tiossemicarbazida canfeno (TSC-C) inibe o crescimento de *Trichophyton mentagrophytes* danificando a estrutura da parede celular ou interferindo na sua formação durante o processo de divisão celular, crescimento ou morfogênese (Yamaguchi et al., 2009). Em função do reconhecido potencial farmacológico de tiossemicarbazida, a associação deste importante grupo farmacofórico com bioprodutos que apresentem características de evolução bioquímica especializada, emerge como estratégia promissora no desenvolvimento de novos fármacos.

[018] Seguindo a estratégia de combinar moléculas ativas para estudar o efeito cooperativo buscando novas moléculas com atividades biológicas, o grupo de

Síntese Orgânica do Instituto de Química da UFG sintetizou em laboratório a TSC-C (Soares et al., 2007).

[019] A presente invenção propõe a utilização de TSC e TSC-C, visando incrementar o perfil farmacológico, no tratamento de micoses.

[020] A tiossemicarbazida (TSC) é comercialmente disponível e foi adquirida da Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Para a obtenção da tiossemicarbazida canfeno (TSC-C), um derivado de isotiocianato foi preparado por adição direta de um excesso de HNCS gerados in situ a canfeno à temperatura ambiente. Subsequentemente, o derivado de isotiocianato (9,57 g; 0,0491 mol) foi adicionado a uma solução de 0,0491 mol de hidrazina em 15 mL de etanol. A mistura foi agitada durante 5 h a 90 ° C e a mistura de reação foi extraída com CHCl₃ e lavou-se com n-hexano. N (4) - [2,2-Dimetil-3-methylnorbornane] - tio-semicarbazida (1): Cristais brancos; rendimento de 85%; pf. 106 -109 ° C; [α] D -105; IV (KBr): (NH) 3261, (C = S) 1532; EI-MS m / z 227 (M + •); ¹H-RMN: δ 5,36 (1H, brs, H-2), 1,83-1,98 (2H, m, H-3), 2,56 (1H, m, H-4), 1,75-1,79 (2H, m, H-5), 1,92-2,05 (2H, m, H-6), 1,50 (3H, s, H-8), 1,48 (3H, s, H-9), 1,64 (3H, s, H-10); ¹³C-RMN: δ 134,3 (C-1), 120,7 (C-2), 26,7 (C-3), 41,4 (C-4), 24,3 (C-5), 30,8 (C-6), 58,2 (C -7), 24,2 (C-8), 24,6 (C-9), 23,5 (C-10) e 180,7 (C-3 ') (C = S).

EXEMPLO 1: Avaliação da capacidade inibitória de TSC e TSC-C sobre células leveduriformes de Paracoccidioides sp.

[021] Preparação da solução de rezasurin - Rezasurin pó (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em água destilada estéril a uma concentração final de 0,02% e, em seguida, esterilizada por filtração e armazenada a 4 ° C até à sua utilização.

[022] Preparação das soluções de TSC e TSC-C: A solução estoque da tiossemicarbazida foi preparada em água esterilizada, e esta foi utilizada para preparar diluições subsequentes para obter as concentrações testadas (5.47 mM, 2.73 mM, 1.36 mM, 684 µM, 343 µM). A solução de estoque do derivado canfeno tiossemicarbazida foi preparada em dimetil-sulfóxido (DMSO a 10%), e esta foi utilizada para preparar as diluições subsequentes para obter as

concentrações testadas (316 μM , 158 μM , 79 μM , 39,5 μM e 19,5 μM). A determinação da Concentração inibitória foi realizada de acordo com o método de micro-diluição descrito no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e De Paula et al. Em cada poço da microplaca, foi inoculado 1×10^6 células / mL de células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. em meio líquido MMcm suplementado com TSC e TSC-C nas concentrações citadas acima. Para determinar a taxa de crescimento máxima (controle positivo) das células, alguns poços receberam meio de cultura em substituição aos 100 μL das diluições do composto em teste. As placas foram incubadas a 36 ° C com agitação a 150 rpm durante 48 horas. No passo subsequente, 15 μL da solução de Rezasurin foi adicionado em cada poço e reincubada por 24 horas. A leitura foi realizada medindo a absorbância a 600 nm.

EXEMPLO 2: Avaliação da viabilidade celular de células leveduriformes *Paracoccidioides* sp. na presença TSC-C

[023] A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante azul de tripan. Foram inoculadas 1×10^6 células/mL de *Paracoccidioides* sp. em meio líquido MMcM suplementado com 79 μM de TSC-C, concentração correspondente ao IC₅₀ (concentração que inibiu 50% do crescimento fúngico). O controle negativo foi realizado na ausência do composto. A contagem de células viáveis foi realizada numa câmara de Neubauer no tempo de 0, 1, 2, 3, 4, 8 e 24 h. Para a contagem, 10 mL de solução de células foram adicionados a 190 μL de azul de tripan, acrescentando PBS 1X para um volume final de 1 mL. As células foram observadas ao microscópio óptico com lente de 40 vezes.

EXEMPLO 3: Avaliação da sensibilidade *Paracoccidioides* sp. na presença de TSC-C derivado tiosemicarbazida canfeno

[024] O teste de sensibilidade em placas foi realizada utilizando meio Fava-Neto semi-sólido, suplementado com TSC-C nas concentrações de 39,5 μM , 79 μM , 158 μM e 316 μM . Placas de controle negativo foram preparadas na ausência TSC-C. Um total de 10^5 , 10^6 e 10^7 células foram inoculadas em cada placa, sendo posteriormente incubadas durante 7 dias a 36 ° C e fotografadas.

EXEMPLO 4: Avaliação da citotoxicidade de TSC e TSC-C em células BALB/c 3T3

[025] As células basais BALB/c 3T3, 1×10^5 células/poço, foram distribuídas em microplacas de 96 poços, em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico. Por 48 h as células foram expostas a oito concentrações de TSC e TSC-C (15,6-2000 $\mu\text{g/mL}$), estas obtidas por diluição seriada, mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2 , a 37°C . Após a exposição, as soluções foram retiradas. Em cada micropoço foi adicionado 25 $\mu\text{g/mL}$ de solução de vermelho neutro e incubado por 4 h na mesma condição anterior. O sobrenadante foi removido e cada micropoço foi lavado com PBS; foi adicionada solução fixadora de vermelho neutro (1% de ácido acético, 49% de água deionizada, 50% de etanol) e após solubilização a absorbância foi quantificada por espectrofotometria, em uma leitora de microplacas a 560 nm.

[026] A absorbância obtida das células-controle foi considerada como 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular foi calculada utilizando a mesma fórmula do método de redução do MTT. Foram realizados dois experimentos independentes e as concentrações em sexplicata.

EXEMPLO 5: Avaliação dos efeitos de TSC e TSC-C sobre a atividade enzimática de importantes enzimas do metabolismo de *Paracoccidioides sp.*

[027] Para as análises da atividade da superóxido dismutase (SOD), primeiramente foi obtido o extrato proteico de células leveduriformes, após incubação com TSC-C durante 8 h. As células controle foram incubadas na MMcM sem o composto. Para a análise de atividade enzimática das outras enzimas, foi feito o extrato de células sem tratamento e esse extrato foi incubado com os compostos por 1 hora antes da avaliação das atividades das enzimas.

[028] As células foram centrifugadas a 10.000 g durante 15 min a 4°C , sendo a proteína extraída com tampão de extração (20 mM Tris - HCl pH 8,8 ; CaCl_2 2 mM) contendo uma mistura de inibidores de protease (GE Healthcare).

[029] Após a adição de pérolas de vidro (0,45 milímetros), as células foram lisadas por agitação intensa, seguido por centrifugação a 10.000 xg durante 15 min a 4 ° C. O sobrenadante foi recolhido e as concentrações de proteína foram determinadas usando o reagente de Bradford (Sigma - Aldrich).

Superóxido dismutase

[030] A atividade enzimática da superóxido dismutase foi medida usando kits disponíveis comercialmente (SOD ensaio Kit da Sigma-Aldrich) e 1µg/ml de proteínas extraídas de *Paracoccidioides* spp. O Kit de ensaio de SOD utiliza o sal tetrazólio, solúvel em água salgada, WST - 1 (2 - [4 - iodofenil] -3 - [4 - nitrofenil] -5 - [2,4- dissulfofenil] - 2H - tetrazólio, sal monossódico), que produz um corante de formazano solúvel em água após a redução com um anião superóxido, e o produto pode ser determinada por um método colorimétrico a 440 nm. Os níveis de atividade enzimática da SOD foram quantificadas através da medição da diminuição da cor a 440 nm.

Formamidase

[031] A atividade enzimática da formamidase foi medida pelo monitoramento da produção de amônia, como descrito anteriormente (Skouloubris et al., 1997). Amostras de 500 ng de prote[inas foram adicionadas a 100mM de formamida, 100 mM de tampão fosfato e 10 mM de EDTA, com pH 7,4. A reação foi incubada a 37 °C por 30 min. Logo após o tempo de incubação, 400 mL de fenol-nitroprussiato e 400 mL de solução alcalina de hipoclorito (Sigma Aldrich) foram adicionadas. As amostras foram então incubadas a 50 °C por 6 min e a absorbância foi lida a 625 nm. A quantidade de amônia liberada foi determinada por comparação com uma curva padrão. Uma unidade (U) de atividade de formamidase foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolizar 1 µmol de formamida por minute por miligrama de protein total (1 µmol/min.mg).

β -1,3 - Glicosidase

[032] O ensaio da β -1,3-glicosidase foi realizado conforme anteriormente descrito (Ramada et al., 2010).

O ensaio foi feito em microplaca usando 10 µL de extrato proteico e 20 µL de laminarina 0.25% (p/v). Essa mistura foi incubada a 40 °C por 15 min. Ap[os a incubação, 100 µL de solução DNS (0.687% w/v DNS, 1.28% v/v fenol, 19.92% w/v Na-K-tartarato and 1.226% w/v NaOH) foi adicionada e a reação foi incubada por 5 min a 95 °C. A reação foi resfriada por 2 min a 25 °C e 100 µL da mistura foi transferido para uma microplaca de 96 poços. A atividade de β - 1,3-glicosidase (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 µmol de açúcar redutor por minute por mg de proteína (1 µmol/min.mg), usando um padrão de glucose de 2 mg/mL.

Malato desidrogenase

[033] A atividade da malato desidrogenase foi medida pela diminuição da absorbância a 340 nm, resultando na oxidação de NADH, conforme Cox et al. (2005). Foi preparada uma reação contendo 50 mM de fosfato com pH 8.0, 100 µM de NADH e 1 mM de oxalacetato. As reações foram iniciadas pela adição de 60 ng de proteína em uma solução de 3 mL de reação. U da enzima é responsável pela catálise de 1 µmol de substrato por minute por mg de proteína (1 µmol/min.mg). O coeficiente de extinção molar de NADH é $6.2 \times 10^3 / \text{M.cm}$.

Citrato sintase e Metilcitrato sintase

[034] A enzima citrato sintase catalisa a reação entre acetil CoA e oxalacetato para formar ácido cítrico. A enzima metilcitrato sintase catalisa a reação entre propionil-CoA e oxalacetato para formar metilcitrato. A hidrólise do tioéster de acetil CoA ou do propionil CoA resulta na formação de CoA com um grupo tiol (CoA-SH). O tiol reage com DTNB para formar TNB.

[035] Esse produto amarelo (TNB) é observado espectrofotometricamente pela medida da absorbância a 412 nm. Para o ensaio, 3 µg de extrato proteico foram adicionados a 1 mM de DTNB, 0.2 mM de acetil CoA (para citrato sintase) ou 0.2 mM de propionil CoA (para metilcitrato sintase) e o volume final foi ajustado para 150 µL com 50 mM de Tris/HCl, pH 8.0. A reação foi iniciada pela adição de uma concentração final de 1 mM de oxalacetato e a absorbância foi definida como a conversão de 1 µmol de acetil CoA em citrate

ou propionil CoA em metilcitrato por mg de extrato proteico (1 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$), usando uma curva de TNB.

EXEMPLO 6: Avaliação dos efeitos de TSC-C sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por Paracoccidioides sp.

[036] As células de Paracoccidioides sp. foram preparadas inoculando 1×10^6 células/mL em meio líquido Fava Neto por 3 dias. Após foram incubadas em meio líquido MMcM a 36 °C sob agitação suave, durante 16 h. As células foram centrifugadas a 5000 x g durante 5 min e transferidos para o meio contendo MMcM e 79 μM TSC-C por 4, 8 e 12 h. As células controles foram incubadas sem o derivado tiossemicarbazida canfeno.

[037] No passo posterior, as células foram centrifugadas e incubadas com 20 μM de 2', 7'- diclorofluoresceína - durante 30 min. As amostras foram analisadas em microscópio Axio Scope A1 e software Axio LE Vison (Carl Zeiss AG, Germany) e por citometria de fluxo BD Accuri C6 citômetro (Accuri Citômetros, Ann Arbor, MI, EUA) sendo, um total de 10.000 células por amostra foi adquirida com o canal FL1 -H.

EXEMPLO 7: Avaliação dos efeitos de TSC-C sobre o potencial da membrana mitocondrial de Paracoccidioides sp.

[038] O potencial de membrana mitocondrial foi medido usando rodamina 123 (Rho123). As células de levedura foram tratados com 79 μM de TSC-C por 4, 8 e 12 h. Após o tratamento, as células foram recolhidas em centrífuga e incubadas com 20 μM Rho123 durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 1 mL de PBS e analisadas pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6 com excitação e emissão de comprimentos de onda de 488 e 530 nm, respectivamente.

EXEMPLO 8: Avaliação dos efeitos de TSC-C sobre o ciclo celular de Paracoccidioides sp.

[039] O conteúdo de DNA das células de levedura na fase G0/G1, S e fases G2 / M foi medida usando fluxo BD Accuri C6 citômetro (Accuri Citômetro). As células foram incubadas com 79 μM de tiossemicarbazida por 4, 8 e 12 h.

Após o tratamento, as células foram recolhidas, lavadas com PBS 1x e fixadas com etanol absoluto frio durante a noite a 4 ° C. Após lavar duas vezes com PBS 1x, as células foram incubadas com 1 mL solução de iodeto de propídio (2 mg / mL), 50 mL de RNase A (10 mg / mL de RNase A) por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Um total de 10.000 células por amostra foram adquiridos com o canal FL2-H. Os dados foram coletados e analisados por meio do software FCS 4 Plus (Denovo Software, Los Angeles, CA, EUA).

EXEMPLO 9: Avaliação da influência de TSC e TSC-C sobre a transição micélio-levedura

[040] A transição de micélio para levedura foi realizada no meio mínimo Mc Veigh Morton (MMcM) (Restrepo, 1980). A temperatura de cultivo foi mudada de 26 °C para 36 °C para que ocorresse a transição de micélio para levedura. As células do micélio foram crescidas previamente em meio líquido por 18 h a 26 °C, então foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de 85.3 µM para TSC e 17.2 µM para TSC-C e a temperatura foi mudada para 36 °C, que foi mantida por 120 h. O aparecimento de leveduras foi monitorado diariamente usando uma câmara de Neubauer.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses **caracterizado por** ser antifúngico com base na sua capacidade inibitória das células de *Paracoccidioides* sp.
2. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** possuir concentração inibitória mínima e citotoxicidade de TSC e TSC-C.
3. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** possuir inibição da atividade enzimática de superóxido dismutase, enzima importante na detoxificação.
4. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** possuir inibição da atividade enzimática de enzimas importantes do metabolismo do fungo.
5. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** possuir indução de espécies reativas de oxigênio.
6. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** desestabilização do potencial de membrana mitocondrial.
7. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** possuir inibição do ciclo celular.
8. Utilização de tiossemicarbazida e do derivado tiossemicarbazida canfeno no tratamento de micoses conforme reivindicação 1 **caracterizado por** possuir influência de TSC e TSC-C na transição dimórfica.

RESUMO**UTILIZAÇÃO DE TIOSSEMICARBAZIDA E DO DERIVADO TIOSSEMICARBAZIDA CANFENO NO TRATAMENTO DE MICOSES**

A presente patente se refere à descoberta de um novo composto com potencial candidato a protótipo de fármaco, uma vez que o mesmo apresenta alta capacidade inibitória do crescimento de *Paracoccidioides* sp. agindo sobre a atividade enzimática de superóxido dismutase, enzima importante no processo de detoxificação, desestabilização do potencial mitocondrial, inibição do ciclo celular e indução de espécies reativas de oxigênio. Essa nova descoberta, aliada ao fato de TSC-C ser um composto com características importantes para um protótipo de fármaco, com baixíssima citotoxicidade, visa à construção de antifúngicos mais específicos e conseqüentemente mais efetivos e com menores efeitos colaterais aos pacientes.