



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS**

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO* DE CANDIDATOS
ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E NATURAIS CONTRA *Sporothrix brasiliensis***

Niterói, RJ

2021

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO* DE CANDIDATOS
ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E NATURAIS CONTRA *Sporothrix brasiliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Micologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Regina de Souza Baptista

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Helena Carla Castro

Niterói, RJ

2021

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

S719i Souza, Lais Cavalcanti dos Santos Velasco de
Investigação in vitro, in vivo e in silico de candidatos
antifúngicos sintéticos e naturais contra *Sporothrix*
brasiliensis / Lais Cavalcanti dos Santos Velasco de Souza ;
Andréa Regina de Souza Baptista, orientadora ; Helena Carla
Castro, coorientadora. Niterói, 2021.
113 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,
2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2021.d.11846486700>

1. *Sporothrix brasiliensis*. 2. Novos antimicrobianos. 3.
Esporotricose felina. 4. Micologia. 5. Produção intelectual.
I. Baptista, Andréa Regina de Souza, orientadora. II. Castro,
Helena Carla, coorientadora. III. Universidade Federal
Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD -

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO* DE CANDIDATOS
ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E NATURAIS CONTRA *Sporothrix brasiliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.
Área de Concentração: Micologia

Aprovada em: 29 de Outubro de 2021

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Andréa Regina de Souza Baptista – Instituto Biomédico (UFF)

Prof^a. Dr^a. Márcia Ribeiro Pinto da Silva – Instituto Biomédico (UFF)

Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto – Instituto de Biologia (UFF)

Prof^a. Dr^a. Lucimar Ferreira Kneipp – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante – Universidade Federal do Ceará
(UFC)

Niterói, RJ

2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar por ser meu TUDO, em todo tempo. Por ser meu Pai, por me fazer sonhar e acreditar nas promessas Dele sobre minha vida; por me abençoar em detalhes e me presentear com uma família e amigos inigualáveis;

Ao meu esposo Jefferson Souza (Vida), por todo amor, carinho, paciência, incentivo, e paciência, palavras de ânimo, e mais paciência... Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma, por compreender minha ausência inúmeras vezes devido aos estudos, por sonhar esse sonho junto comigo e por mesmo sem compreender quase nada das minhas pesquisas, me ouvir reclamar ou desabafar ou ter novas ideias e até mesmo tentar me dar novas ideias;

Aos meus filhotes lindos, Pedro Souza e Lyvia Souza, que fazem a minha vida e minhas conquistas terem mais sentido. Obrigada pelas risadas, brincadeiras e os maravilhosos momentos de “relaxamento”, pela companhia nas madrugadas de estudo mesmo que fosse dormindo no meu colo. Amo muito vocês!!

À minha mãe Deise Cavalcanti, meu exemplo, minha base, minha intercessora, minha maior incentivadora, meu amor. Obrigada por simplesmente TUDO desde sempre. Por me fazer amar ler e estudar desde criança, por confiar em mim e embarcar em todas as minhas maluquices, me apoiando e incentivando incondicionalmente. Pelos lanches, cafés das manhãs, almoços reforçados, saudáveis e cheios de amor;

Aos meus avós, Joel dos Santos, Corina Cavalcanti e Zilda Velasco, meus tios, Delma Cavalcanti e Marcos Oliveira e minha sogra Berenice de Souza, por todo amor, auxílio, incentivo, palavras de ânimo, risadas, orações e confiança em mim;

Ao meu pai, Eliezer Velasco, exemplo e fonte de inspiração. Obrigada por me estimular a leitura (de gibis) desde criança e me ensinar com exemplo que sonhos se conquistam com persistência, foco e determinação;

À “MINHA” orientadora linda, prof. Dra. Andréa Regina de Souza Baptista, por toda paciência, carinho, cuidado, dedicação que me ensinou e ensina diariamente a não somente ser uma doutora ou pesquisadora ou professora, mas sim uma profissional, ética, coerente, dedicada e brilhante, com seu exemplo;

À minha BEST, Dra. Pâmella Macêdo-Sales, por todos os segundos de podcast no whatsapp, pelos infindáveis “Momentos de Terapia”. Obrigada por me ouvir, por me ensinar, por brigar e até mesmo se calar quando era necessário. Por me fazer rir absurdamente, por compartilhar teorias cristãs fundadas nas nossas cabeças, por me fazer passar vergonha no shopping e entre outras alegrias;

Ao meu amigo, que não presta, mestrando Lucas Martins. Obrigada por me aturar absurdamente, por ser meu braço direito nesse último ano de doutorado. Por me fazer rir de quase tudo e conseguir tirar a tensão de várias situações complicadas. Obrigada por amar a Disney como eu e entender minhas piadas, conhecer as infantis músicas que tenho necessidade de cantarolar e pacientemente me auxiliar;

À minha linda e meiga amiga mestranda Nathália Reis por todo auxílio, carinho, risadas, doces e sorvetes. Obrigada por compartilhar os infinitos artigos e discussões sobre metodologias, por ter aprendido a amar nossas “filhas” (*Galleria*). Por me ouvir, por falar, me compreender e auxiliar nas nossas pesquisas com muito carinho, dedicação e presteza;

Aos meus amigos/colegas do CIM, em especial às minhas anjinhas, Ma. Simone Brito e Ma. Aína Ramirez por toda ajuda, dedicação, risadas, carinho, “ouvidos” e comidas maravilhosas que me fazem feliz;

Ao prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, por todo, carinho, dedicação e maravilhosas histórias que nos ensina e inspira;

A prof. Dra. Helena Carla Castro, por todo carinho, ensinamentos e auxílio a mim ofertados durante todo o período de orientação e coorientação;

Aos ICs maravilhosos que ao longo desse período passaram por mim, Thayane Caldas, Sthephany Pires. Aos ICs emprestados, que quase tomei pose como MEUS, Renan Caetano, Amanda Ribeiro e Júlia Andrade. Vocês são ótimos!!

Aos meus amigos, por serem fontes de alegria, constante amor, incentivo, paciência e compreensão;

Ao meu amigo, parceiro científico e grande professor, Dr. Bruno Leal, por me apresentar a pesquisa, me ensinar, me fazer sonhar e acompanhar, mesmo de longe nesses últimos anos, toda a minha trajetória até aqui, com apoio, carinho e alegria;

Ao prof. Dr. Leandro Rocha e seu Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN/Faculdade de Farmácia), pela parceria não somente no fornecimento dos extratos brutos, mas no muito aprendizado, dedicação e carinho;

Ao prof. Dr. André Luís Souza dos Santos e ao Laboratório de Estudos Avançados para Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER/UFRJ) pela incrível parceria e colaboração nas minhas pesquisas e em especial a Lucieri Souza por ser um anjo científico auxiliando e ensinando sempre com muita competência, carinho e atenção;

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, nas pessoas do prof. Dr. Felipe Piedade e prof. Dr. Bruno Penna, pela oportunidade, por todo conhecimento ministrado a partir de maravilhosas aulas e eventos;

Aos professores por todo conhecimento ministrado, aulas integrativas e estimulantes que proporciona a aprendizagem continua e significativa;

Aos colaboradores da Química Orgânica da UFF; Faculdade de Farmácia da UFF; UFRJ e IFF;

Agradeço à Banca Examinadora pelos ensinamentos compartilhados;

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERJ e CNPQ pelo incentivo financeiro;

E... sim, a palavra de ordem aqui é GRATIDÃO!!

“Faça todo o bem que puder; Por todos os meios que puder; De todas as maneiras que você pode; Em todos os lugares que você puder; Em todas as vezes que você puder; Para todas as pessoas que você puder; Enquanto você pode sempre.”

John Wesley

RESUMO

A esporotricose é uma zoonose hiperendêmica negligenciada no Brasil e o *Sporothrix brasiliensis* é o principal agente causador dessa micose em gatos e humanos. A recente expansão continental e a conhecida distribuição geográfica da esporotricose no Brasil, associada às dificuldades no tratamento eficaz dos felinos domésticos mostra a necessidade premente da busca de alternativas terapêuticas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo prospectar uma gama de derivados sintéticos e extratos naturais quanto aos potenciais antifúngicos *in vitro* e *in silico* e *in vivo* contra isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Estes foram isolados de gatos residentes da região hiperendêmica, Rio de Janeiro, Brazil. Seis isolados originaram-se de lesões esporotricóticas de felinos domésticos com idade média de 3,5 anos, 83,3% (5/6) com acesso à rua, principalmente machos (4/6 felinos), metade deles castrados. O tratamento se deu pelo itraconazol, variando de 2 a 60 meses na dosagem de 100 mg/gato/dia. Setenta e oito derivados sintéticos inéditos de oito classes químicas distintas (pirazol, pirazolona, quinolona, quinona, naftoquinona, hidrazona, N-ftalimida e fenantrolina) foram triados por disco difusão (M2-A8 CLSI, 2003). Após, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de três derivados da hidrazona, onze derivados da quinona, três quelatos da fenantrolina e sete extratos brutos advindos de quatro diferentes espécies de plantas (*Ocotea pulchella*, *Ocotea notata*, *Myrciaria floribunda* e *Hypericum brasiliense*) foram determinadas por microdiluição em caldo (M38-A2, 2008 e M27-A3, 2008). Todos os derivados sintéticos e extratos naturais também foram avaliados quanto à concentração fungicida mínima (CFM). Testes *in silico* foram usados para predição do perfil farmacológico e de toxicidade dos derivados sintéticos. Testes *in vivo* a partir do modelo animal invertebrado *Galleria mellonella* foram realizados a fim de avaliar a eficácia do fendio e seus derivados de cobre (II) e prata (I) do sal perclorato, escolhidos devido a melhor performance *in vitro*. Aproximadamente vinte e dois por cento de todos os derivados sintéticos (17/78; hidrazonas, quinonas e fenantrolinas), foram ativos contra as leveduras da maioria dos isolados, enquanto um deles (fenantrolinas) foi também ativo contra a forma saprofítica do *S. brasiliensis*. Os MICs e MFCs obtidos contra as hidrazonas variaram entre 1-16 µg/mL, enquanto para as quinonas, entre 32 -> 128 µg/mL. Já para os quelatos da fenantrolina, tais valores variaram entre 0,03 - 0,002 µM. Os resultados frente aos extratos naturais variaram entre 1 -> 128 µg/mL. Não foi predita toxicidade elevada pela análise computacional ADMET e um bom perfil farmacológico preditivo, com parâmetros semelhantes ao itraconazol, foi obtido para todas as hidrazonas e quelatos. As larvas de *Galleria mellonella*, uma vez tratadas com os quelatos da fenantrolina, tiveram importante aumento no percentual de sobrevivência. Nossos dados sugerem que três derivados de hidrazona, os três quelatos da fenantrolina e também os extratos brutos, principalmente da *Ocotea notata* e da *Myrciaria floribunda*, são promissores candidatos a fármacos antifúngicos.

PALAVRA-CHAVE: Esporotricose, *Felis catus*, Quinonas, Hidrazonas, Fenantrolinas Extratos Brutos.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a neglected hyperendemic zoonosis in Brazil and *Sporothrix brasiliensis* is the main causative agent of this mycosis in cats and humans. The recent continental expansion and the known geographic distribution of sporotrichosis in Brazil, associated with the difficulties in the effective treatment of domestic cats, show the urgent need to search for therapeutic alternatives. Therefore, this work aimed to prospect a range of synthetic derivatives and natural extracts for *in vitro* and *in silico* and *in vivo* antifungal potentials against clinical isolates of *S. brasiliensis*. These were isolated from cats residing in the hyperendemic region, Rio de Janeiro, Brazil. Six isolates originated from sporotrichotic lesions of domestic cats with an average age of 3.5 years, 83.3% (5/6) with access to the street, mainly males (4/6 cats), half of them castrated. Treatment of election with itraconazole, ranging from 2 to 60 months at a dosage of 100 mg/cat/day was prescribed. Seventy-eight novel synthetic derivatives from eight distinct chemical classes (pyrazole, pyrazolone, quinolone, quinone, naphthoquinone, hydrazone, N-phthalimide and phenanthroline) were screened by disk diffusion (M2-A8 CLSI, 2003). Afterwards, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of three hydrazone derivatives, eleven quinone derivatives, three phenanthroline chelates and seven crude extracts from four different plant species (*Ocotea pulchella*, *Ocotea notata*, *Myrciaria floribunda* and *Hypericum brasiliense*) were determined by broth microdilution (M38-A2, 2008 and M27-A3, 2008). All synthetic derivatives and natural extracts were also evaluated for minimum fungicidal concentration (MFC). *In silico* tests were used to predict the pharmacological and toxicity profiles of the synthetic derivatives. *In vivo* tests using the *Galleria mellonella* invertebrate animal model were performed in order to evaluate the effectiveness of fendium and its copper (II) and silver (I) perchlorate salt derivatives, chosen for their best *in vitro* performances. Approximately twenty-two percent of all synthetic derivatives (17/78; hydrazones, quinones and phenanthrolines) were active against the yeasts of most isolates, while one of them (phenanthrolines) was also active against the saprophytic form of *S. brasiliensis*. The MICs and MFCs obtained against hydrazones ranged between 1-16 µg/mL, while for quinones, between 32 -> 128 µg/mL. As for the phenanthroline chelates, these values ranged between 0.03 - 0.002 µM. The results against natural extracts ranged from 1 -> 128 µg/mL. High toxicity was not predicted by computational ADMET analysis and a good predictive pharmacological profile, with parameters similar to itraconazole, was obtained for all hydrazones and chelates. *Galleria mellonella* larvae, once treated with the three phenanthroline chelates, had an important increase in the percentage of survival. Our data suggest that three hydrazone derivatives, the three phenanthroline chelates and also the crude extracts, mainly from *Ocotea notata* and *Myrciaria floribunda*, are promising candidates for antifungal drugs.

KEYWORDS: Sporotrichosis, *Felis catus*, Quinones, Hydrazones, Phenanthrolines and Crude Extracts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Micromorfologia após 10 dias de cultivo na fase filamentosa, com formação “em margarida” dos conídios ao redor do conidióforo observado em microscópio óptico (400X). Fonte: Arquivo CIM, Niterói 2021.	18
Figura 2: Macromorfologia das colônias de <i>Sporothrix</i> spp. em meio ágar PDA (do inglês, Potato Dextrose Ágar) após 14 dias de cultivo. Fonte: Acervo pessoal.	18
Figura 3: Micromorfologia das leveduras de <i>S. brasiliensis</i> (ATCC MYA 4823) após quatro (04) dias de crescimento em meio líquido YPD (do inglês, Yeast Extract Peptone Dextrose). Leveduras com formas e tamanhos variados, podendo ser arredondada ou até ovalada, semelhante ao formato de um charuto, Fonte: Arquivo CIM.	19
Figura 4: Macromorfologia de leveduras <i>S. brasiliensis</i> (ATCC MYA 4823) cultivadas em meio ágar BHI (do inglês, Brain Heart Infusion) após 5 dias de cultivo. Fonte: Acervo pessoal.	19
Figura 5, Adaptada: Municípios com os maiores números de casos notificados e confirmados de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, em 2019. Fonte: Boletim epidemiológico 001/2021 (20).	21
Figura 6, Adaptada: Municípios com os maiores números de casos notificados e confirmados de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, em 2020. Fonte: Boletim epidemiológico 001/2021 (20).	22
Figura 7: Tabela com registro de casos de esporotricose felina em alguns municípios de São Paulo entre 2011 a 2019. #: Dados parciais de 1º janeiro de 2019 até 31 de julho de 2019; a: Dados de 1º janeiro de 2019 até 31 de dezembro 2019. Informações obtidas do Centro de Controle Zoonótico (CCZ) da cidade de São Paulo e Guarulhos (9).	22
Figura 8: Gato com esporotricose, apresentando múltiplas lesões ulceradas na cabeça, mucosa e membros. Fonte: Arquivo CIM.	25
Figura 9: Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação dos agentes antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose felina. Fonte: Acervo pessoal.	28
Figura 10: Imagem da Autorização do CEUA, protocolo 208/2012. Fonte: Arquivo CIM.	102

Figura 11: Imagem da Autorização do CEUA, protocolo 7561040518; junho 14, 2018.

Fonte: Arquivo CIM 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos notificados suspeitos de esporotricose, segundo classificação final e ano de início de sintomas. Dados do estado do Rio de Janeiro nos anos 2015 - 2018	20
Tabela 2: Atividade biológica relacionadas as classes químicas dos derivados sintéticos e dos extratos brutos testados no presente trabalho.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	da língua inglesa <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	da língua inglesa <i>Brain-Heart Infusion</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCZ	Centro de Controle de Zoonótico
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM*	Centro de Investigação de Microrganismos
CLSI	da língua inglesa <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CYPs	Enzimas do citocromo P450
ECVs	da língua inglesa <i>Epidemiological Cutoff Values</i>
EUA	Estados Unidos da América
ERG	Gene de Fator de Transcrição
EUCAST	da língua inglesa <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAPERJ	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FFP	Faculdade de Formação de Professores
GDTVZ	Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
<i>H. brasiliense</i>	<i>Hypericum brasiliense</i>
HERG	da língua inglesa Human Ether-à-go-go-Related Gene
INI-FIOCRUZ	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz
ITRA	Itraconazol
LABIEMOL	Laboratório de Antibióticos, Bioquímica, Educação e Modelagem Molecular
LOAEL	da língua inglesa Lowest Observed Adverse Effect Level
LTPN	Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais

LSNC	Laboratório de Síntese de Nucleosídeos e Carboidratos
<i>M. floribunda</i>	<i>Myrciaria floribunda</i>
MOPS	da língua inglesa 3-(<i>N-Morpholino</i>)propane sulfonic acid
NWT	da língua inglesa Não- <i>Wild Type</i>
<i>O. notata</i>	<i>Ocotea notata</i>
<i>O. pulchella</i>	<i>Ocotea pulchella</i>
PBS	da língua inglesa <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDA	da língua inglesa Potato Dextrose Ágar
PPGMPA	Programa de Pós Graduação de Microbiologia e Parasitologia Aplicadas
PROPPI	Pró Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação
ROS	da língua inglesa Reactive Oxygen Species
RPMI	da língua inglesa <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S.bra</i>	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
<i>S. brasiliensis</i>	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
SDA	da língua inglesa <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SES	Secretaria Estadual de Saúde
<i>S. globosa</i>	<i>Sporothrix globosa</i>
<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
SISBIO	Sistema e Autorização e Informação em Biodiversidade
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional
SUS	Sistema Único de Saúde
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VDSs	da língua inglesa Volume of Distribution at Steady-State
WT	da língua inglesa <i>Wild Type</i>
YPD	da língua inglesa Yeast Extract Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Breve Histórico.....	16
1.2. Classificação do <i>Sporothrix</i> spp e Características Gerais.....	17
1.3. Epidemiologia da Esporotricose.....	20
1.4. Manifestações clínicas da Esporotricose.....	24
1.4.Opções Terapêuticas para o Tratamento da Esporotricose e Mecanismos de Resistência Antifúngica.....	26
1.5. Fonte de Novos Protótipos	29
1.6. Justificativa.....	32
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.2. Objetivos Específicos.....	34
3. ARTIGO 1.....	35
4. ARTIGO 2.....	51
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. ANEXOS	102
8.1 Comitê de Ética.....	102
8.2 Produções científicas.....	104
8.3. Orientações Acadêmicas.....	111

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de implantação traumática, que acomete animais e humanos em todo mundo (1). A partir do manejo de material orgânico contaminado, propágulos do patógeno são introduzidos no indivíduo, caracterizando a via clássica de transmissão (Doença do Jardineiro) (2). A via de transmissão alternativa (via zoonótica) é a mais prevalente em solo brasileiro, onde a esporotricose possui caráter zoonótico, hiperendêmico, com o felino doméstico sendo o mais afetado (2). O *Sporohrix brasiliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil, relacionada diretamente a essa dermatozoonose transmitida por gatos (1,2).

1.1. Breve Histórico

A esporotricose foi descrita pela primeira vez em 1898 nos Estados Unidos (EUA) pelo estudante de medicina Benjamim Schenck, no Hospital Johns Hopkins - Baltimore. Schenck relatou o primeiro isolamento do fungo causador da esporotricose a partir de um paciente do sexo masculino, 36 anos, apresentando lesões no membro superior direito. Ele encaminhou o paciente ao micologista Erwin Smith, que classificou o microrganismo como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (1,3). A doença foi descrita novamente em Chicago/EUA, por Hektoen e Perkins, dois anos depois do primeiro relato. Estes cientistas isolaram o fungo a partir do aspirado da lesão cutânea no dedo de um paciente que havia sofrido um trauma com um martelo. Eles classificaram pela primeira vez o agente etiológico como *Sporothrix schenckii* (3,4). Na Europa, o primeiro caso de esporotricose foi relatado por Beurmann e Ramond três anos após a descrição americana (1901). O microrganismo foi nomeado *Sporotrichum beurmanni* por Ramond e Matruchot devido uma diferença na coloração da colônia em relação a original obtida por Schenck. Os pesquisadores perceberam que a colônia havia perdido a pigmentação, levando-os a concluir que se tratava de espécies distintas. Em 1910, Matruchot redescreve o isolado obtido por Schenck como *Sporotrichum schenckii*. Davis, em 1921, estudando isolados oriundos dos casos ocorridos na América e na França concluiu que ambos pertenciam a mesma espécie, identificando-a como *Sporotrichum schenckii* (1,3). No Brasil, em 1907, Lutz e Splendore foram os

primeiros a relatarem um caso de esporotricose em humanos e ratos e demonstraram a possibilidade de cultivar a levedura *in vitro* (5).

Ao redor do mundo, a transmissão da esporotricose ocorre a partir de traumas ou microtraumas, devido ao manejo de matéria orgânica vegetal contaminada, culminando na inoculação subcutânea do fungo, via clássica dessa micose (transmissão sapronótica) (1,6). Devido à sua via clássica de transmissão, a esporotricose também é conhecida como a “doença do jardineiro” ou “doença da roseira” (6,7). Ao final da década de 90, no Brasil em particular no estado do Rio de Janeiro, a forma clássica sapronótica de transmissão tornou-se coadjuvante da via alternativa de transmissão (zoonótica) já que o quadro epidêmico instalado depende diretamente de seu hospedeiro animal, o gato doméstico (1). Assim, neste cenário geográfico, o agravo assumiu caráter zoonótico e atualmente, hiperendêmico, nunca descrito antes neste país (1,8,9).

1.2. Classificação do *Sporothrix* spp e Características Gerais

O gênero *Sporothrix*, até alguns anos atrás era composto por uma única espécie, o *S. schenkii* e classificado na divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales* e família *Moniliaceae* (10). Atualmente, a classificação taxonômica foi atualizada após estudos morfofisiológicos e moleculares, resultando na seguinte classificação: divisão *Eumycota*, reino *Fungi*, sub-reino *Dikarya*, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes*, subclasse *Sordariomycetidae*, ordem *Ophiostomatales* e família *Ophiostomataceae*, gênero *Sporothrix* (11).

Os fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix* são termodimórficos, sapróbios e estão distribuídos amplamente na natureza, em solo rico em matéria orgânica em decomposição, folhas secas, madeira, espinhos de plantas e musgos, (12).

O termodimorfismo apresentado pelo gênero *Sporothrix*, faz com que em temperatura ambiente (cerca de 25°C) eles apresentem sua forma filamentosa com hifas hialinas, septadas e delgadas, com presença de conídios em forma de gota ao redor do conidióforo em formato de “margarida” (Figura 1).



Figura 1: Micromorfologia após 10 dias de cultivo na fase filamentosa, com formação “em margarida” dos conídios ao redor do conidióforo observado em microscópio óptico (400X). Fonte: Arquivo CIM, Niterói 2021.

Macroscopicamente, as colônias do *Sporothrix* spp. cultivadas *in vitro* em Ágar Batata Dextrose apresentam inicialmente coloração branca ou creme e ao envelhecer elas tendem a alcançar tons marrons escuros ou pretos (Figura 2).



Figura 2: Macromorfologia das colônias de *Sporothrix* spp. em meio ágar PDA (do inglês, Potato Dextrose Ágar) após 14 dias de cultivo. Fonte: Acervo pessoal.

A partir de um estímulo da temperatura corporal ($\approx 37^{\circ}\text{C}$), esses microrganismos se apresentam como levedura, forma parasitária, comumente encontrada nas lesões dos animais, com grande carga microbiana nos felinos (9,13). Estas leveduras possuem tamanho e forma variadas, podendo ser ovais ou

arredondadas com cerca de 2 a 6 μm de diâmetro, semelhantes ao formato de um charuto (Figura 3) (10).

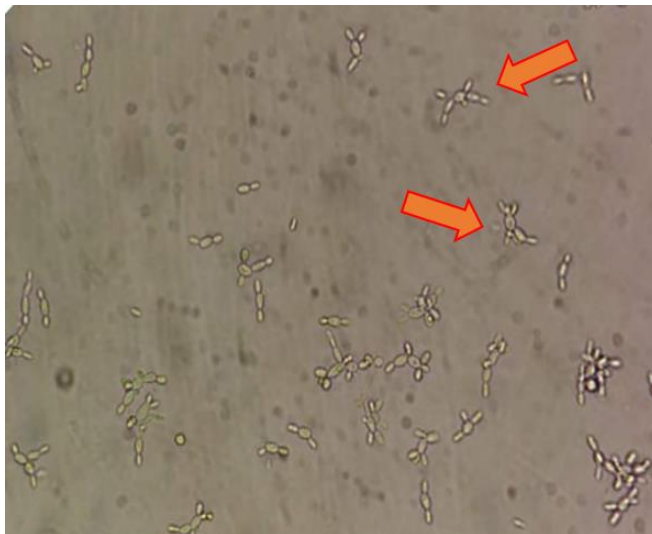


Figura 3: Micromorfologia das leveduras de *S. brasiliensis* (ATCC MYA 4823) após quatro (04) dias de crescimento em meio líquido YPD (do inglês, Yeast Extract Peptone Dextrose). Leveduras com formas e tamanhos variados, podendo ser arredondada ou até ovalada, semelhante ao formato de um charuto, Fonte: Arquivo CIM.

Macroscopicamente, quando cultivadas *in vitro* em Ágar BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*), as leveduras apresentam coloração bege ou creme com aparência cerebriforme (Figura 4) (10).



Figura 4: Macromorfologia de leveduras *S. brasiliensis* (ATCC MYA 4823) cultivadas em meio ágar BHI (do inglês, Brain Heart Infusion) após 5 dias de cultivo. Fonte: Acervo pessoal.

1.3. Epidemiologia da Esporotricose

O *Sporothrix brasiliensis*, é a espécie fúngica majoritariamente predominante no Brasil, com números crescentes e alarmantes de casos (4,14,15). Entre o final da década de 90 até o ano de 2011 foram notificados pelo centro de referência em esporotricose do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ) mais de 4.000 casos em humanos, 4.700 casos felinos e 244 casos caninos (2,8). Micose de notificação compulsória no estado do Rio de Janeiro a partir de 2013 para os casos humanos, e a partir de 2014 para os casos de caninos e felinos acometidos, através das resoluções SES nº674 de 12 de junho de 2013 e a portaria GM/MS nº1.271 de 6 de junho de 2014, no artigo 2º, parágrafo IV, respectivamente. Outros estados brasileiros também aderiram a notificação compulsória como Pernambuco, (Portaria SES/PE Nº 390 de 14/09/2016), Paraíba (Resolução CIB/SES-PB nº 80/18 de 07/08/2018), Minas Gerais (apenas casos humanos) (Resolução SES/MG nº 6532), além de alguns municípios como Guarulhos (São Paulo), Camaçari (Bahia), Salvador (Portaria Municipal 191 de 2018) e João Pessoa (Resolução 001/2018 da Secretaria Municipal de Saúde, publica no Semanário nº 1642) (16,17).

Os alarmantes números vinculados a esporotricose felina e humana têm sido relatados por boletins epidemiológicos publicados pela Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses do estado do Rio de Janeiro (GDTVZ) e eles mostram que entre 2015 e 2017 foram 4.403 casos notificados suspeitos, sendo 3.291 diagnósticos confirmados para esporotricose (74,7%) (18) (Tabela 1). O perfil de humanos infectados com *Sporothrix* spp. no estado até o ano 2018 foram predominantemente do sexo feminino e a faixa etária mais acometidas pela doença é a partir de 50 anos de idade (19). A transmissão dessa doença para o homem foi na maior parte dos casos confirmados através de arranhadura (19).

Tabela 1: Casos notificados suspeitos de esporotricose, segundo classificação final e ano de início de sintomas. Dados do estado do Rio de Janeiro nos anos 2015 - 2018

Ano	Total de Casos Suspeitos	Casos Confirmados		Casos Descartados		Casos Ignorados/Branco	
		N	%	N	%	N	%
		2015	1177	792	67,3	30	2,5

2016	1485	1124	75,7	21	1,4	340	22,9
2017	1741	1375	79,0	22	1,3	344	19,8
2018*	319	219	68,7	1	0,3	99	31,0

*2018: notificação até 18 de maio; N: dado numérico; %: porcentagem relacionada ao dado numérico correspondente. Fonte: Boletim epidemiológico de 2018 (18).

Segundo o último boletim emitido pela GDTVZ em 21 de Abril de 2021, no ano de 2019 foram notificados e confirmados 1586 casos de esporotricose no RJ, com maior incidência de relatos nos municípios do Rio de Janeiro e Nova Iguaçu, conforme Figura 5. O predomínio de acometidos pela doença são mulheres (990/1586) (20).

Em 2020 houve 1030 casos de esporotricose notificados e confirmados no estado do Rio de Janeiro. Percebe-se que os números diminuíram no último ano, contudo, Giordano (2021) sinaliza que uma possível subnotificação dos casos pode ter ocorrido devido a pandemia de Covid-19. Os municípios com maiores números de notificações permanecem o Rio de Janeiro e Nova Iguaçu (Figura 6), com maior acometimento em mulheres (611/1030) e faixa etária mais afetada, em ambos os anos, entre 40 e 59 anos (20).

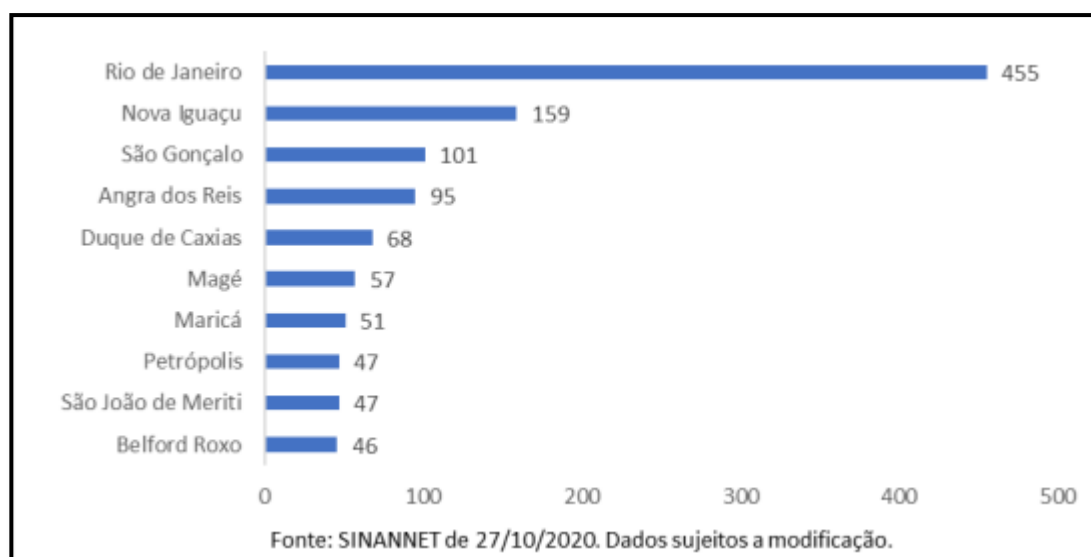


Figura 5, Adaptada: Municípios com os maiores números de casos notificados e confirmados de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, em 2019. Fonte: Adaptado do boletim epidemiológico 001/2021 (20).

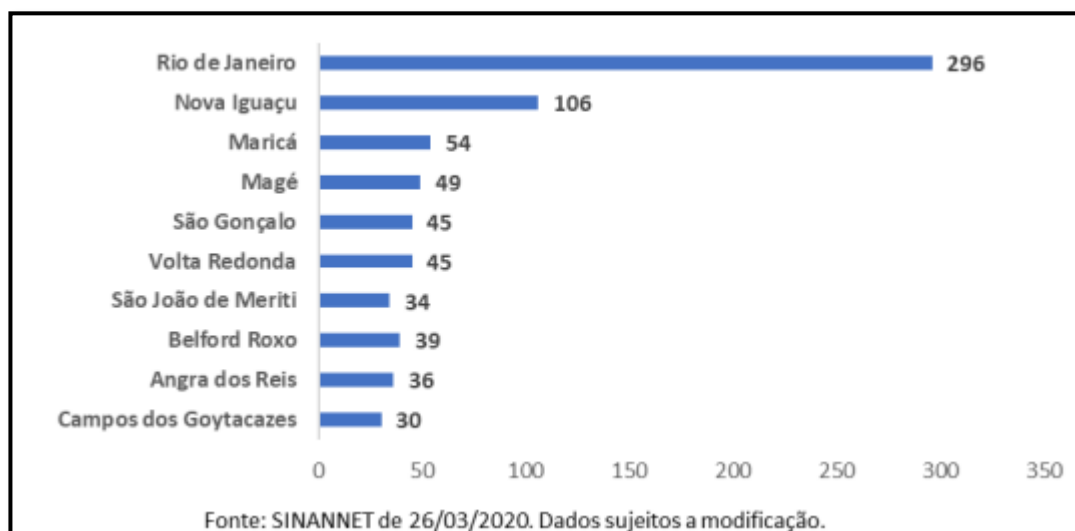


Figura 6, Adaptada: Municípios com os maiores números de casos notificados e confirmados de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, em 2020. Fonte: Adaptado do boletim epidemiológico 001/2021 (20).

Outros estados da região Sudeste e Sul do Brasil, principalmente Rio Grande do Sul e São Paulo têm notificado diversos casos de esporotricose felina (8,15). Um estudo retrospectivo realizado na Universidade Federal de Pelotas mostrou que no período entre 2005 e 2016, dos 284 animais diagnosticados com esporotricose, 229 eram gatos (21). A seguir, dados publicados por Gremião e colaboradores (2021) mostram casos de esporotricose felina registrados em alguns municípios do estado de São Paulo entre 2011 e 2019 (Figura 7).

City	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019 [#]	Total
Guarulhos	2	5	9	24	171	490	923	929	1229 ^a	3782
São Paulo	71	47	47	86	85	122	172	432	292	1354
Diadema		4		4	10	84	69	10	28	209
Itaquaquecetuba						14	45	1	1	61
Peruibe							4	24	32	60
São José do Rio Preto						2	34			36
Caraguatatuba						2	6	13	3	24
Anujá							3	12	1	16
Barueri							2	8		10
Campinas							1	1		2

Figura 7: Tabela com registro de casos de esporotricose felina em alguns municípios de São Paulo entre 2011 a 2019. #: Dados parciais de 1º janeiro de 2019 até 31 de julho de 2019; a: Dados de 1º janeiro de 2019 até 31 de dezembro 2019. Informações obtidas do Centro de Controle Zoonótico (CCZ) da cidade de São Paulo e Guarulhos (9).

Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste tem registrado um notável aumento do número de casos de esporotricose nos últimos 5 anos (Mato Grosso, Mato Grosso do sul, Distrito Federal, Rio Grande do Norte, Paraíba Alagoas, Acre e Pará) (9). Segundo a Secretaria de Estado da Saúde (SES) da Paraíba, até 2018 a incidência de esporotricose na região nordeste era de menos de 20 casos anuais, contudo essa realidade modificou e no ano de 2019 foram notificados mais de 700 casos de esporotricose humana nessa região (22). Um surto de esporotricose felina em Pernambuco foi relatado a partir de um conjunto de 115 amostras coletadas entre março de 2014 e fevereiro de 2016 de felinos atendidos em clínicas veterinárias particulares em Recife, regiões metropolitanas e no Hospital Veterinário da UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco), com mais da metade positivas para esporotricose (51,30%; n=59) (23).

Doença de distribuição geográfica mundial, a esporotricose apresenta altas taxas de prevalências em regiões de clima tropical e subtropical úmido (1). Considerada como a micose mais prevalente da América Latina, com uma estimativa de mais de cinco mil gatos acometidos (8,15), em diversos países como Peru, Uruguai, México, Costa Rica, Guatemala, Colômbia, Venezuela, Argentina e o Brasil (8,24,25). Relatos de esporotricose em solo mexicano, nos estados de Jalisco e Puebla, são causados principalmente pelo *Sporothrix schenckii* (26).

Relatos recentes mostram *S. brasiliensis* não é mais uma espécie de exclusividade brasileira. Um estudo retrospectivo realizado na Argentina, com 23 (vinte e três) cepas de *S. schenckii* lato sensu coletadas entre 1984 e 2017 e submetidas à identificação molecular, mostrou que oito (8/23) dessas cepas foram identificadas como *S. brasiliensis* (27). Recentemente, relatos de transmissão zoonótica de *S. brasiliensis* em duas pessoas a partir da arranhadura de um gato doméstico doente na Argentina (28,29), evidencia a expansão geográfica dessa espécie com características singulares, grande virulência e responsável pela epidemia zoonótica no Brasil (1,15).

No Continente Americano, o agente etiológico com maior ocorrência, responsável pela esporotricose felina e humana é a espécie *S. schenckii* (8,30), enquanto que no continente asiático, a epidemia sapronótica de esporotricose é ocasionada pelo *Sporothrix globosa*. Essa epidemia, até o momento, acomete exclusivamente humanos e atinge diversos países asiáticos como Japão e China

(1,31). Contudo, o *S. globosa* apresenta ocorrência mundial, acometendo indivíduos na Europa, Estados Unidos e América do Sul (31).

1.4. Manifestações clínicas da Esporotricose

As manifestações clínicas da esporotricose humana podem variar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, a carga microbiana, a virulência do patógeno, profundidade do tecido atingido, entre outros fatores (4). Inicialmente, ocorre a formação de um nódulo ou pápula no local onde houve a inoculação do fungo. O fungo pode permanecer nesse sítio, forma cutânea-fixa ou progredir, afetando vasos linfáticos adjacentes, resultando na forma de linfangite nodular ascendente ou linfocutânea (manifestação clínica clássica da doença em humanos) (4,32).

Raramente a inalação dos conídios deste fungo desencadeia o acometimento dos pulmões de indivíduos hígidos, contudo, a esporotricose pulmonar pode ocorrer e em indivíduos imunocomprometidos, evoluir para forma disseminada (4). Diversas manifestações clínicas atípicas têm sido descritas devido a hiperendemia zoonótica da esporotricose brasileira, bem como formas extracutâneas, culminando em variadas respostas terapêuticas (4,33).

Contudo, no homem, a esporotricose tem seu curso benigno, com baixa carga microbiana na maioria dos casos, o que não observamos nos felinos domésticos acometidos. Isolados clínicos oriundos de lesões de gatos com esporotricose exibem abundantes leveduras, mostrando-os como hospedeiro mais susceptível à infecção pelo *S. brasiliensis* (8).

O felino doméstico possui um papel imprescindível no panorama da epidemia da esporotricose brasileira devido ao seu comportamento e outros fatores imunológicos ainda desconhecidos. Quando adultos, os gatos têm hábitos noturnos de saída em busca de caça ou rituais reprodutivos (14,34) que podem ocasionar brigas, contato direto com matéria orgânica contaminada facilitando sua infecção pela via saprofítica ou transmissão horizontal entre animais (2). Os felinos doentes apresentam grande quantidade de leveduras nas lesões, mas também podem carrear o agente fúngico nas unhas e na cavidade oral (14,34).

As lesões dos felinos domésticos apresentam pobre infiltrado linfocitário, característica que sugere a ineficiência imunológica felina em relação ao

controle do crescimento fúngico (35–37),. Possivelmente, essa característica está relacionada a alta carga microbiana nas lesões dos gatos, mas outros fatores podem estar relacionados, como por exemplo os hábitos de lambar e coçar as feridas, ocasionando a formação de “reservatórios” de estruturas fúngicas, nas unhas e na cavidade oral (14).

A infecção desses gatos também ocorre por meio de uma injúria cutânea e o fungo se dissemina através do sistema linfático, produzindo um quadro de linfagite e linfadenite (38). Após a inoculação, a evolução clínica desses animais pode apresentar distintas manifestações clínicas: cutânea fixa, cutâneo-linfática, ou ainda disseminada (14,38). A principal manifestação clínica é a cutânea. Com múltiplas lesões ou lesão única, ulceradas na pele (cutânea disseminada) comumente nas extremidades da cabeça, com acometimento da mucosa, membros, base da cauda e escroto (Figura 8) (9,12). Essas lesões, em alguns casos, podem transforma-se em lesões necróticas, com tecido subjacentes expostos (38).



Figura 8: Gato com esporotricose, apresentando múltiplas lesões ulceradas na cabeça, mucosa e membros. Fonte: Arquivo CIM.

A gravidade dessas manifestações clínicas está relacionada com a resposta imunológica do felino, a carga fúngica inoculada e a patogenicidade da cepa fúngica (12,34). Histologicamente, podemos encontrar nas lesões cutâneas, uma resposta inflamatória predominantemente granulomatosa, com variações

principalmente quanto ao predomínio de macrófagos ou de células epitelíodes, além dos demais componentes da resposta inflamatória (35).

1.4. Opções Terapêuticas para o Tratamento da Esporotricose e Mecanismos de Resistência Antifúngica

Mundialmente, as infecções fúngicas são um problema para saúde pública devido a altas taxas morbimortalidade e o número limitado de antifúngicos que por sua vez possuem altos índices de toxicidade e crescentes relatos de resistência. Ademais, a terapia antifúngica requer muita cautela, pois há muitas semelhanças fisiológicas e bioquímicas entre as células do hospedeiro e a célula fúngica (39). Cada antifúngico apresenta um mecanismo de ação e eles são classificados de acordo com a ação exercida nas células fúngicas, podendo ser fungicidas, substâncias que matam as células, ou fungistáticos, substâncias que inibem o crescimento fúngico (40).

Os fármacos pertencentes à família dos azóis possuem um amplo espectro de ação, biodisponibilidade oral, baixa toxicidade e em geral apresentam ação fungistática,. O mecanismo azólico ocorre a partir da inibição da biossíntese de ergosterol, evitando a conversão do lanosterol em ergosterol através da inibição da enzima 14- α desmetilase do citocromo P450, alterando a permeabilidade da membrana fúngica, e também sua morfologia (Figura 8) (39).

O itraconazol, antifúngico de primeira escolha para o tratamento da esporotricose em felinos e humanos, pertence à família dos triazóis apresentando eficácia e baixa ocorrência dos efeitos adversos em humanos (41,42). Contudo, a difícil administração oral diária ao felino, que acarreta perigo ao cuidador de ser infectado (arranhões e/ou mordidas), o alto custo e período prolongado de tratamento, além de relatos não responsivos, resultam em uma ineficiência terapêutica relacionada a esse fármaco (14,43).

Em casos de terapia não responsiva ao itraconazol, a associação com a anfotericina B pode ser considerada uma alternativa (42,43). Os poliênos apresentam um amplo espectro de atividade e baixos relatos de resistência, com baixa absorção pelo trato intestinal, sendo necessária sua administração por via intravenosa. A anfotericina B atua em infecções fúngicas superficiais e invasivas,

contudo, apresentam alta toxicidade principalmente em relação às células do rim, pois essas células são vulneráveis à ação hemolítica desse poliêno. Na medicina veterinária sua utilização é limitada, pois não é tolerado pela maior parte dos pacientes (intravenoso), contudo é uma opção para tratamento de esporotricose refratária (43,44). O mecanismo de ação ocorre a partir da formação de “poros” na membrana celular fúngica quando o antifúngico se liga ao ergosterol presente na mesma, facilitando a saída de íons monovalentes e outros conteúdos citoplasmáticos (Figura 8). Os polienos também podem utilizar um mecanismo que envolve uma cascata de reações de oxidação e interações com lipoproteínas (Figura 8), liberando radicais livres, afetando também a permeabilidade da membrana fúngica (39).

As alilaminas possuem boa biodisponibilidade oral, são altamente lipofílicas, podem ser armazenadas no tecido adiposo e permanecem ativas no organismo após o término do tratamento. Esta classe atua nas etapas iniciais da biossíntese do ergosterol visando a inibição da enzima escaleno epoxidase codificada pelo gene ERG1 (Figura 8). A inibição dessa enzima resulta no acúmulo de escaleno e ausência de outros derivados do esteroide (39). Essa classe é representada pelas terbinafinas e naftifina, que são altamente eficazes contra os dermatófitos e leveduras que causam infecções superficiais em cães e gatos (39,42). No entanto, seu potencial terapêutico se restringe ao tratamento da esporotricose em humanos, sendo uma opção em casos com terapia irresponsiva ao itraconazol (42).

O iodeto de potássio era comumente ministrado aos felinos domésticos acometidos com esporotricose, mas os mesmos sofriam muitos efeitos adversos como depressão, anorexia, vômito, espasmos musculares, cardiomiopatia, pelagem seca, entre outros (42,45). Atualmente, o iodeto é administrado aos gatos, associado ao itraconazol como opção terapêutica em situações irresponsivas. Não há muitos estudos sobre os mecanismos de ação do iodeto de potássio, porém a literatura sugere que ele é responsável pelo aumento da resposta imune do hospedeiro (42,46).

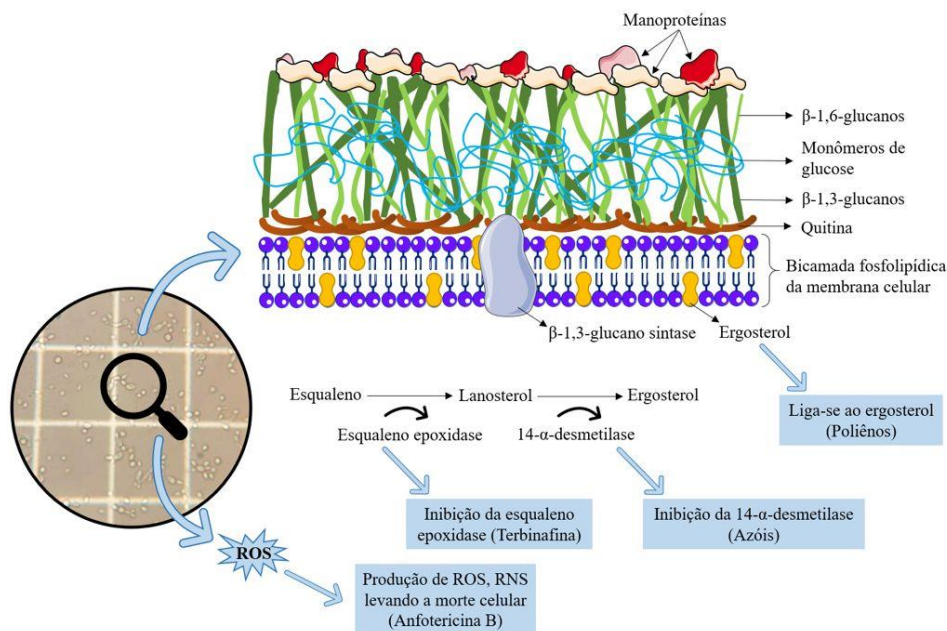


Figura 9: Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação dos agentes antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose felina. Fonte: Adaptada Scorzoni *et al.*, 2017 (39)

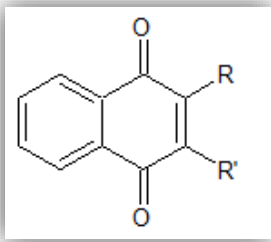
Ao longo dos anos, muitos microrganismos, como os fungos, desenvolveram diversos mecanismos de resistência como por exemplo a superexpressão de proteínas, bomba de efluxo, entre outros (39). Essa resistência microbiana ocorre quando um patógeno é inibido somente por uma concentração antimicrobiana mais alta do que os valores estabelecidos a partir de determinados pontos de corte (47). A resistência aos fármacos azólicos ocorre principalmente após a mutação no gene ERG_{11} que codifica o alvo (14 α -desmetilase CYP51), alterando assim o domínio de ligação dos azóis (39). Outro mecanismo de resistência é a alteração na expressão da bomba de efluxo de genes transportadores da família ABC, CDR1, CDR2, MDR1 (39,47). O mecanismo de bomba de efluxo também pode estar relacionado a resistência de outros antifúngicos como a terbinafina, e a anfotericina B (39). Há poucos relatos de resistência relacionados a anfotericina B, entretanto, as principais alterações envolvidas na resistência ao poliêno estão associadas a defeitos nos genes ERG_2 e ERG_3 que são responsáveis por codificar a C8-esterol isomerase e $\Delta 5,6$ -dessaturase, ocasionando modificações quantitativas e qualitativas, respectivamente, do esterol presente na membrana fúngica, promovendo uma baixa quantidade do mesmo na membrana, diminuindo as ligações entre o fármaco e o ergosterol, não havendo assim a formação dos “poros” (39,47).

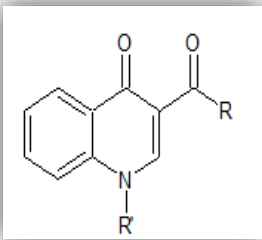
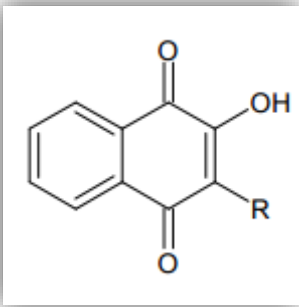
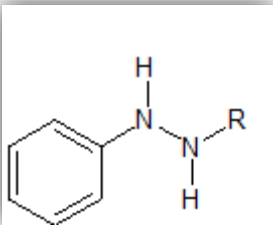
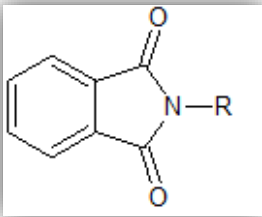
Outro possível mecanismo de resistência aos polienos é o aumento na produção de catalase, diminuindo o dano oxidativo do fármaco (39,47).

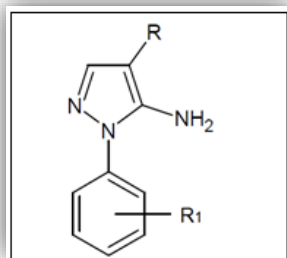
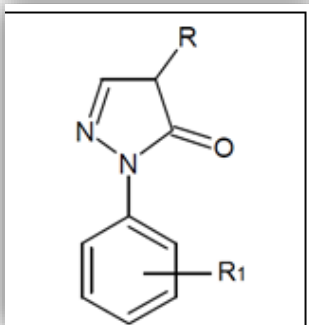
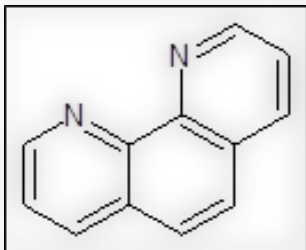

1.5. Fonte de Novos Protótipos




O desenvolvimento da pesquisa e a descoberta de novos protótipos a agentes antifúngicos ocorre a longo prazo, possui alto custo e tem recebido pouca atenção das indústrias farmacêuticas em relação, por exemplo, as infecções virais e bacterianas. No que concerne a infecções por *Sporothrix* spp, poucos derivados sintéticos (48–50), extratos brutos (51) e óleos essenciais (52–54) foram investigados até o momento. A busca de novos antimicrobianos de origem vegetal, animal, sintética ou semissintética que permitam o tratamento de infecções causadas por organismos patogênicos como o *Sporothrix* spp. é de grande interesse e relevância mundial (48). Diversas classes químicas e extratos naturais têm sido estudados e possuem diversas propriedades biológicas conforme podemos observar na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Atividade biológica relacionadas as classes químicas dos derivados sintéticos e dos extratos brutos testados no presente trabalho.

Protótipos a Antifúngicos		Atividades Biológicas	Referência	Núcleo-base dos derivados sintéticos / Espécies de planta
Derivados Químicos	Quinonas	Antiparasitária, antibacteriana, antimalárico, antitumoral, antipirético e antifúngico, inclusive contra <i>S. schenckii</i> .	(55–60)	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>

<p>Quinolonas</p>	<p>Antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, anticâncer</p>	<p>(61–66)</p>	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>
<p>Naftoquinonas</p>	<p>Antifúngica, antitumorais, tripanocida, antibacteriana, antiparasitário, anti-inflamatória e anticâncer.</p>	<p>(67–74)</p>	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>
<p>Hidrazonas</p>	<p>Antifúngica, antibacteriana, antiproliferativa contra células tumorais, antiangiogênica.</p>	<p>(75–80)</p>	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>
<p>N-ftalimidas</p>	<p>Antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica.</p>	<p>(81–85)</p>	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>

	Pirazóis	Antifúngica, analgésica, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antimalárico, antioxidante e anticâncer.	(86–95)	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>
	Pirazolonas	Antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatória, antimalárico, analgésico.	(95–100)	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>
	1,10-fenantrolina-5,6-diona	Antifúngica, antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoário, antioxidante e anticâncer.	(101,102,111–114,103–110)	 <p>Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH</p>
Extratos Naturais	<i>Ocotea notata</i>	Antiviral, antimicobacteriana, inibidora da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos e antioxidante	(115–117)	 <p>Fonte: Herbário da FFP-UERJ/RJ.</p>

<i>Ocotea pulchella</i>	Alelopática e antiviral	(118–120)	 <p>Fonte: Herbário da FFP-UERJ/RJ.</p>
<i>Hypericum brasiliense</i>	Antibacteriana, antifúngica, antidepressiva, antiofídica, anti-inflamatória e analgésica	(121–125)	 <p>Fonte: Herbário da FFP-UERJ/RJ.</p>
<i>Myrciaria floribunda</i>	Capacidade antiproliferativa contra células tumorais, antioxidante, inseticida, acaricida, antibacteriano e anticolinesterásico	(126–128)	 <p>Fonte: Herbário da FFP-UERJ/RJ.</p>

FFP- UERJ: Faculdade de Formação de Professores da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

1.6. Justificativa

Nas últimas décadas as infecções fúngicas são consideradas um grave problema de Saúde Pública devido ao aumento do número de pacientes acometidos e também morbimortalidade relacionada. A esporotricose durante décadas e até o momento negligenciado, tem se expandido por diversas cidades, adquirindo caráter hiperendêmico no nosso país e com expansão para outros países da espécie de maior virulência, o *S. brasiliensis*. Essa micose emergente de grande risco a saúde pública, tem o felino doméstico como principal disseminador e maior

vítima com relatos de casos clínicos mais graves e intensa carga microbiana nas lesões. A clínica observada nos gatos é o resultado de diversos fatores imunológicos do felino, virulência do isolado fúngico e quantidade carga microbiana no ato da infecção que agravam esse quadro e dificulta cada vez mais o tratamento dessa micose.

Atualmente, o limitado acervo terapêutico também prejudica o tratamento da esporotricose felina. Além disso, o alto custo dos antifúngicos, longo período de tratamento, a toxicidade relacionada a essas drogas e os relatos na literatura de isolados “resistentes” a droga de eleição demonstram a gravidade do cenário atual. Diante disso, a descoberta de derivados com propriedades antifúngicas contra espécies patogênicas de *Sporothrix*, minimizando os efeitos adversos e facilitando a via administrativa, será decisiva para o controle desta importante zoonose negligenciada.

Além dos reconhecidos fatores que, em conjunto, aumentam a sobrevida de pacientes imunodebilitados, outros componentes contribuem para tal fenômeno. Dentre eles, os limitados recursos terapêuticos, a ausência de ferramentas diagnósticas adequadas, a carência de profilaxia por meio de vacinas, bem como a escassez de estudos acerca da epidemiologia, biologia celular/bioquímica e patogenicidade dos agentes causadores das micoses humanas e animais. Nessa direção, até o momento, pouco se conhece sobre o quanto características intrínsecas do *S. brasiliensis* podem impactar a dinâmica da esporotricose felina no estado do Rio de Janeiro. Por conseguinte, muito resta por ser revelado quanto à sua resposta aos antifúngicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e *in silico*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Prospectar uma gama de derivados sintéticos e compostos naturais por testes *in vitro*, *in vivo* e *in silico* das propriedades antifúngicas contra *S. brasiliensis* obtidos de gatos com esporotricose.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIMs) de derivados sintéticos ativos previamente rastreados e de compostos naturais contra isolados clínicos de *S. brasiliensis*;
- Avaliar os efeitos de derivados ativos e compostos naturais na viabilidade celular de *S. brasiliensis*, classificando a ação antimicrobiana como fungicida ou fungistática;
- Comparar os novos derivados sintéticos e os potenciais perfis de sensibilidade antifúngica de origem natural de isolados clínicos de *S. brasiliensis* “sensíveis” e “resistentes” ao itraconazol;
- Verificar *in vivo* a potencial ação antimicrobiana, a partir do modelo invertebrado *Galleria mellonella*, dos derivados sintéticos triados *in vitro*.
- Analisar os perfis farmacológicos dos derivados sintéticos *in silico* para avaliação do potencial antifúngico.

3. ARTIGO 1

SYNTHETIC DERIVATIVES AND NATURAL EXTRACTS AGAINST *Sporothrix brasiliensis* WITH DISTINCT RESPONSE TO ITRACONAZOLE: *IN VITRO* AND *IN SILICO* EVALUATIONS

A esporotricose é uma micose de ocorrência mundial, com grande incidência no Brasil, destacando o status hiperendêmico do estado do Rio de Janeiro e o *Sporothrix brasiliensis* como principal autor dessa zoonose. Recentemente relatos na literatura mostraram a expansão continental dessa emergente espécie, além da conhecida distribuição geográfica no Brasil. Ademais, dificuldades de tratamento efetivo dos felinos domésticos, o tempo prolongado desse tratamento, alto custo do antifúngico de eleição e os relatos de isolados de *S. brasiliensis* com sensibilidade diminuída mostram à premente necessidade de novas alternativas terapêuticas. Com o objetivo de contribuir possivelmente para o enfrentamento dessa zoonose, prospectando uma gama de derivados sintéticos e extratos naturais para avaliação de potenciais propriedades antifúngicas *in vitro* e *in silico* contra isolados de *S. brasiliensis*, foram estabelecidas colaborações. Logo, este artigo é resultado das parcerias do Centro de Investigação de Microrganismos (CIM/UFF), coordenado pela Profa. Dra. Andrea Regina de Souza Baptista, com os colaboradores do Laboratório de Estudos Avançados de Microorganismos Emergentes e Resistentes (UFRJ), coordenado pelo Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos, o Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN/UFF), coordenado pelo Prof. Dr. Leandro Machado Rocha, o Laboratório de Síntese de Nucleosídeos e Carboidratos (LSNC/UFF), coordenado pelo Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira e o Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABIEMOL), coordenado pela Profa. Dra. Helena Carla Castro. Por fim, o manuscrito desse artigo será submetido (Outubro/2021), para revista científica Pharmaceuticals (Fator de Impacto 5.863).



Synthetic derivatives and crude extracts against wild type and non-wild type *Sporothrix brasiliensis*: *in vitro* and *in silico* analysis

Lais Cavalcanti dos Santos Velasco de Souza¹, Lucas Martins Alcântara¹, Pâmella Antunes de Macêdo-Sales¹, Nathália Faria Reis¹, Débora Sena de Oliveira¹, Ricardo Luiz Dantas Machado¹, Reinaldo Barros Geraldo², Vítor Francisco Ferreira³, André Luís Souza dos Santos⁴, Leandro Rocha⁵, Helena Carla Castro² e Andréa Regina Souza Baptista^{1,*}.

- 1 Center for Microorganisms' Investigation, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil.
 - 2 Laboratory of Antibiotics, Biochemistry and Molecular Modeling, Institute of Biology, Fluminense Federal University- Niterói, RJ, Brazil.
 - 3 Nucleoside and Carbohydrate Synthesis Laboratory, Institute of Chemistry, Fluminense Federal University - Niterói, RJ, Brazil.
 - 4 Laboratory of Advanced Studies of Emerging and Resistant Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
 - 5 Natural Products Technology Laboratory, Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University - Niterói, RJ, Brazil.
- * Correspondence: E-mail: andrearegina@id.uff.br. Tel.: +55-21-2629-2559

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recently, the well-known geographical wide distribution of sporotrichosis in Brazil, combined with difficulties on effective domestic feline treatment, reveals the pressing need for new therapeutic alternatives. This work aimed at prospecting a range of synthetic derivatives and crude plant extracts as potential antifungals against isolates of *Sporothrix brasiliensis* isolated from cats residing in the hyperendemic Brazilian region. Six *S. brasiliensis* isolates originated from domestic cats sporotrichotic lesions were included. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the three novel hydrazone derivatives, eleven novel quinone derivatives, and seven crude plant extracts were determined using the broth microdilution method (M38-A2). *In silico* tests were used to predict the pharmacological profile and toxicity parameters of the synthetic derivatives. Cats treatment with itraconazole ranged from 2 to 60 months in a dosage of 100 mg/cat/day. MICs and MFCs ranged from 1 - >128 µg/mL. The ADMET computational analysis did not show toxicity while a good pharmacological predictive profile, with parameters similar to itraconazole, was obtained. Three hydrazone derivatives and crude extracts, mainly *Ocotea notata* and *Myrciaria floribunda*, were promising candidates as antifungal agents, including the inhibitory and fungicidal actions against itraconazole resistant *S. brasiliensis* from the Brazilian hyperendemics.

Keywords: Sporotrichosis; *Felis catus*; Quinones; Hydrazones; Plant extracts, Zoonoses

1. Introduction

Sporotrichosis is a post-traumatic implantation subcutaneous mycosis of worldwide occurrence and increasing incidence, especially in tropical and subtropical regions such as Asia and Latin America. In Brazil it is a hyperendemic neglected zoonosis and a major Public health concern [1,2]. The pathogenic fungi causing this dermatozoonosis, from the *Sporothrix* genus, are thermo-dimorphic and saprophytic microorganisms [2]. *Sporothrix brasiliensis* is the most prevalent species in Brazil, directly related to the cat-transmitted zoonotic route in this country [2,3]. The recent detection of feline and human patients with *S. brasiliensis*-caused sporotrichosis in Argentina [4,5] revealed its dissemination in South America. One of the main challenges to be addressed in this scenario is the occurrence of

severe irresponsive forms of this mycosis in cats, in addition to recurrences and reinfections [3,6].

Currently, the drug of choice for sporotrichosis treatment is itraconazole [7,8]. It was initially introduced as a therapeutic option for felines suffering with severe adverse effects due to the administration of potassium iodide [9]. This azole is hepatotoxic, exclusively administered orally, with a high cost for the affected population, most of them in socially vulnerable [9]. Thus although improved, sporotrichosis therapy remains a crucial unsolved topic for disease control as a reduction in *S. brasiliensis* itraconazole sensitivity to this azole has been reported [8,10,11].

The pharmaceutical industry showed little efforts towards the discovery of new approaches and there is an historical delay on antimicrobial drug options to mitigate the fungal diseases burden. In parallel, a new commercially available antifungal agents research, discovery, and further development occur in the long term and with high costs. In regards to *Sporothrix* spp. infections, few synthetic derivatives, [12–14] crude extracts [15,16] and essential oils [17,18] were investigated and described in the literature. Also, few studies investigate the feline therapeutic follow-up along with the *in vitro* itraconazole performance against *S. brasiliensis*. Therefore, this work aims to determine the potential antifungal properties of a range of synthetic derivatives and crude extracts against wild type and non-wild type *S. brasiliensis* from diseased cats of the Brazilian hyperendemic area.

2. Results

Clinical-epidemiological

Table 1 summarizes the clinical-epidemiological data referring to the six diseased felines from which the *S. brasiliensis* isolates were obtained. More than half were male (66.7%) while half of them, unneutered. The average age of these animals was 3.58 years (SD \pm 3.47 years), ranging from one to ten years. The majority of them were free roaming (83.3%), residing in urban areas with soil and/or plants contact. Lesions were either unique or distributed in different anatomical sites, regardless of disease severity and the extent of itraconazole treatment.

Table 1. Clinical-epidemiological and laboratorial data of domestic cats infected by the six *S. brasiliensis* isolates investigated in the present study.

Clinical/ Epidemiological	Wild Type			Non-Wild Type		
	WT1	WT2	WT3	NWT1	NWT2	NWT 3
Age (years)	10	5	2,5	2	1	1
Sex	M	F	M	M	M	F
Castration	Yes	No	No	Yes	No	Yes
Free roaming	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Anatomical Site	Abdomen, head, chest and pelvic limb	Head and neck	Head, thoracic and pelvic limb	Base of tail and paw	Head	Pelvic limb
Relapse	No	No	Yes	Yes	No	No
Duration of ITC treatment (months)	60	NI	8	>120	NI	2

WT: Wild-Type; NWT: non-Wild Type to ITC [19]; M: male; F: female; ITC: itraconazole; NI: not informed.

Two domestic felines, the carriers of the WT3 and of the NWT1 isolates, presented more than one episode of sporotrichosis relapse. The NWT1 carrier underwent tail amputation

4 years ago and is currently with a new episode of sporotrichosis in the tail stump. Itraconazole treatment ranged from 2 to more than 120 months, in a dosage of 100 mg/cat/day. 81 82

Antifungal susceptibility assay 83

After the positive initial screening by the diffusion disc method, eleven quinone derivatives (Q1-Q11) and three hydrazones (H1-H3) were selected to further investigation by the microdilution broth test against *S. brasiliensis* yeast-like forms. MIC and MFC values of the six clinical isolates and the standard strain against hydrazones, quinones derivatives, crude extracts, and itraconazole are shown in Tables 2, 3 (geometric means to Hydrazones), 4, and 5. 84 85 86 87 88 89

Table 2. *In vitro* susceptibility ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (yeast form) planktonic cells to novel hydrazone derivatives. 90 91

Azole/ Hydrazones		ATCC / Clinical Isolates						
		<i>S.bra</i>	WT 1	WT 2	WT 3	NWT 1	NWT 2	NWT 3
ITC	MIC	2	1	4	1	32	16	8
	MFC	16	8	32	8	>128	128	128
H1	MIC	8	2	4	2	1	8	8
	MFC	4	2	8	2	2	16	8
H2	MIC	8	16	16	8	8	16	8
	MFC	8	16	16	8	16	16	16
H3	MIC	4	2	4	16	1	16	1
	MFC	4	4	8	16	1	16	1

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration. 92 93 94

Table 3. Geometric means generated from the *in vitro* susceptibility ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (yeast form) planktonic cells to novel hydrazone derivatives. 95 96

Azole/ Hydrazones		ATCC / Clinical Isolates		
		<i>S.bra</i>	WT GM	NWT GM
ITC	MIC	2	2	18,6
	MFC	16	16	128
H1	MIC	8	2,7	5,7
	MFC	4	4	8,7
H2	MIC	8	13,3	10,7
	MFC	8	13,3	16
H3	MIC	4	7,3	6
	MFC	4	9,3	6

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration; GM: Geometric Mean. 97 98

A MIC variation between 1 - 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a MFC variation between 8 - >128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for itraconazole against *S. brasiliensis* are observed. Isolates obtained from the lesions of long-term treated cats with recurrent episodes presented the highest MICs for itraconazole (NWT1 MIC = 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; NWT2 MIC = 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and NWT3 MIC = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and also the highest MFCs. 99 100 101 102 103

S. brasiliensis exposure to hydrazones provided MICs varying from 1 - 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while for quinones ranged from 32 to > 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tables 2 and 4). Similarly, hydrazone derivatives exhibited MICs and MFCs with a lower amplitude, ranging from 2- 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 104 105 106

with geometric means (GMs) from 2.7 to 13.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. GMs of the MICs obtained for NWT isolates exposed to H1-H3 were a third to half of those obtained after itraconazole exposure (Table 3). Higher MICs and MFCs were detected, ranging from 32 - > 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the quinone derivatives. The clinical isolate NWT1, from a two years-old domestic feline, irresponsive to 100mg/cat/day treatment with itraconazole, and showing several episodes of relapse, presented *in vitro* results suggestive of sensitivity to the Q8 (MIC/MFC = 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and also to H1, H2 and H3 (MIC = 1-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MFC = 1-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Table 4. *In vitro* susceptibility ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (yeast form) planktonic cells to novel quinone derivatives.

Azole/ Quinones		ATCC / Clinical Isolates						
		S.bra	WT 1	WT 2	WT 3	NWT 1	NWT 2	NWT 3
Itraconazole	MIC	2	1	4	1	32	16	8
	MFC	16	8	32	8	>128	128	128
Q1	MIC	>128	32	>128	NA	128	NA	64
	MFC	>128	32	>128	NA	128	NA	64
Q2	MIC	>128	64	NA	NA	>128	NA	64
	MFC	>128	64	NA	NA	>128	NA	128
Q3	MIC	>128	64	NA	NA	>128	NA	128
	MFC	>128	128	NA	NA	>128	NA	128
Q4	MIC	>128	128	NA	NA	>128	>128	128
	MFC	>128	128	NA	NA	>128	>128	128
Q5	MIC	>128	NA	NA	NA	NA	NA	128
	MFC	>128	NA	NA	NA	NA	NA	128
Q6	MIC	NA	128	NA	NA	NA	NA	64
	MFC	NA	128	NA	NA	NA	NA	64
Q7	MIC	NA	128	NA	NA	NA	NA	64
	MFC	NA	128	NA	NA	NA	NA	64
Q8	MIC	32	128	>128	NA	32	>128	64
	MFC	64	128	>128	NA	32	>128	64
Q9	MIC	>128	128	NA	NA	NA	NA	128
	MFC	>128	128	NA	NA	NA	NA	128
Q10	MIC	128	128	NA	NA	NA	NA	128
	MFC	128	128	NA	NA	NA	NA	128
Q11	MIC	128	64	NA	NA	NA	NA	128
	MFC	128	64	NA	NA	NA	NA	128

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration; NA: Not analyzed due to the lack of evidence during TSA screening.

The WT1 clinical isolate, from the feline treated with itraconazole for 60 months, showed MICs compatible with sensitivity after exposure to itraconazole (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Q1 (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), H1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), H2 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and H3 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Meanwhile, MFCs were respectively Q1 (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), H1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), H2 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and H3 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). WT2 and WT3 exposed to hydrazones exhibited the same phenotype suggestive of sensitivity (Table 2). Quinones MICs and MFCs were also high for Wild-Type isolates (Table 4). MFC obtained for all molecules hidrazone and quinone demonstrated a fungicidal profile.

Table 5 shows the high amplitude of MICs and MFCs (1 - > 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtained for the seven crude extracts against the saprophytic and the yeast forms of *S. brasiliensis* (Table 5). The lowest MICs and MFCs were obtained when both morphotypes of the NWT *S. brasiliensis* were exposed to the *O. notata*^{ea} extract and to also to the *M. floribunda*^{ea} (Table

5). Results obtained from MFC for all extracts demonstrate that they have a fungicidal profile. Table 6 shows the geometric means of the crude extracts against *S. brasiliensis*.

Table 5. Comparison of the *in vitro* susceptibility evaluation ($\mu\text{g/mL}$) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (conidial and yeast form) planktonic cells to crude extracts.

Azole/ Crude extracts		ATCC / Clinical Isolates													
		<i>S. bra</i>		WT 1		WT 2		WT 3		NWT 1		NWT 2		NWT 3	
		C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y
Itraconazole	MIC	1	2	16	1	16	4	16	1	32	32	16	16	16	8
	MFC	8	16	64	8	32	32	64	8	64	>128	64	128	32	128
<i>O. pulchella</i> ^{ea}	MIC	>128	16	>128	32	>128	16	64	64	>128	>128	64	16	128	2
	MFC	>128	16	>128	32	>128	32	64	32	>128	>128	64	8	128	1
<i>O. pulchella</i> ^e	MIC	4	1	>128	32	>128	1	64	1	>128	>128	64	2	64	32
	MFC	4	1	>128	16	>128	2	32	1	>128	>128	32	2	64	32
<i>O. pulchella</i> ^d	MIC	128	>128	64	16	64	8	128	128	64	128	32	>128	64	8
	MFC	128	>128	64	16	64	8	128	128	64	128	32	>128	64	16
<i>M. floribunda</i> ^d	MIC	32	>128	>128	>128	128	4	2	>128	16	16	16	128	16	32
	MFC	32	>128	>128	>128	128	8	2	>128	16	32	8	128	16	32
<i>M. floribunda</i> ^{ea}	MIC	16	32	128	>128	>128	128	8	128	8	4	2	1	4	8
	MFC	16	32	>128	>128	>128	128	8	128	8	4	2	1	4	8
<i>O. notata</i> ^{ea}	MIC	128	64	>128	8	>128	16	8	64	2	2	64	64	128	16
	MFC	128	64	>128	8	>128	8	16	64	4	4	64	64	128	16
<i>H. brasiliense</i> ^h	MIC	128	128	128	>128	>128	64	16	128	16	>128	128	64	64	128
	MFC	128	128	128	>128	>128	64	16	128	32	>128	128	64	64	128

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration; C: conidia; Y: yeast; ^{ea} fraction ethyl acetate; ^e fraction ethanol; ^d fraction dichloromethane; ^h fraction hexane.

Table 6. Geometric means generated from the *in vitro* susceptibility test ($\mu\text{g/mL}$) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (yeast form and conidial form) planktonic cells to crude extracts.

Azole/ Crude extracts		ATCC / Clinical Isolates											
		<i>S. bra</i> (C)		<i>S. bra</i> (Y)		WT (C)		NWT (C)		WT (Y)		NWT (Y)	
						GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM
Itraconazole	MIC	1	2	16	21.3	2	18.7						
	MFC	8	16	53.3	53.3	16	128						
<i>O. pulchella</i> ^{ea}	MIC	>128	16	106.7	106.7	37.3	73						
	MFC	>128	16	106.7	106.7	32	45.7						
<i>O. pulchella</i> ^e	MIC	4	1	106.7	106.7	11.3	54						
	MFC	4	1	96	74.7	6.3	54						
<i>O. pulchella</i> ^d	MIC	128	>128	85.3	53.3	50.7	88						
	MFC	128	>128	85.3	53.3	50.7	90.7						
<i>M. floribunda</i> ^d	MIC	32	>128	86	16	86.7	58.3						
	MFC	32	>128	86	13.3	88	64						
<i>M. floribunda</i> ^{ea}	MIC	16	32	88	4.7	128	4.3						
	MFC	16	32	88	4.7	128	4.3						
<i>O. notata</i> ^{ea}	MIC	128	64	88	64.7	29.3	27.3						
	MFC	128	64	90.7	65.3	26.7	28						
<i>H. brasiliense</i> ^h	MIC	128	128	90.7	64.3	106.7	106.7						
	MFC	128	128	90.7	74.7	106.7	106.7						

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration; GM: Geometric Mean C: conidia; Y: yeast; ^{ea} fraction ethyl acetate; ^e fraction ethanol; ^d fraction dichloromethane; ^h fraction hexane.

Overall, *M. floribunda*^d, *O. pulchella*^{ea}, *O. pulchella*^e and *O. pulchella*^d extracts showed distinct MICs and MFCs, with lower values against the yeast forms of the *S. brasiliensis* isolates, either WT or NWT. MIC and MFC amplitudes ranged from 16 - > 128 µg/mL for *H. brasiliense*^h versus all isolates, regardless the morphotype.

The *in silico* toxicological profile and pharmacokinetics

Toxicity was predicted as described in Table 7. The oral rat acute toxicity (LD50) of all derivatives and itraconazole ranged from 1.952 mol/kg to 2.984 mol/kg. In contrast, oral rat chronic toxicity (LOAEL) varied from 0,055 log mg/kg bw/day to 2.974 mg/kg bw/day. Minnow toxicity varied between -6.407 log LC50 to 0.919 log LC50. Q6, Q7, H1 and H3 did not show evidence of a hepatotoxic effect. No hydrazone was potentially inhibitor of HERG I and II channels, while quinones did not seem to inhibit HERG I. The *in silico* predictions of four toxicological endpoints revealed Q4, Q11, and itraconazole as immunotoxic. And Q4, Q5, and H1 as mutagenic. No compound presented carcinogenic or cytotoxic presumed properties.

Table 7. Toxicological profile *in silico* of synthetic derivatives.

Com- pounds	Toxicity									
	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	Min- now tox- icity	HER G I	HERG II	Hepato- toxicity	Toxicological end points			
	Numeric (mol/kg)	Numeric (log mg/kg_bw/ day)	Nu- meric (log LC 50)	Categorical (Yes/no)			Immuno- toxicity	Carcino- genity	Cyto- toxicity	Muta- genicity
Itra- cona- zole	2.966	0.055	-4.446	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No
Q1	1.952	2.322	-2.223	No	Yes	Yes	No	No	No	No
Q2	2.098	2.398	-2.889	No	Yes	Yes	No	No	No	No
Q3	2.245	2.381	-2.098	No	Yes	Yes	No	No	No	No
Q4	2.580	1.549	-1.846	No	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes
Q5	2.577	1.581	-1.211	No	Yes	Yes	No	No	No	Yes
Q6	2.972	1.221	0.919	No	Yes	No	No	No	No	No
Q7	2.965	2.426	0.274	No	Yes	No	No	No	No	No
Q8	2.711	2.974	-6.407	No	Yes	Yes	No	No	No	No
Q9	2.844	1.724	-0.550	No	No	Yes	No	No	No	No
Q10	2.905	1.578	-1.852	No	Yes	Yes	No	No	No	No
Q11	2.247	2.597	-2.126	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No
H1	2.596	1.380	0.167	No	No	No	No	No	No	Yes
H2	2.549	1.340	0.644	No	No	Yes	No	No	No	No
H3	2.984	1.238	-0.396	No	No	No	No	No	No	No

Itra: Itraconazole; HERG I: Type 1 human ether-a-go-go-related gene; HERG II: Type 1 human ether-a-go-go-related

Table S1: Pharmacokinetics profile *in silico* of synthetic derivatives, summarizes the *in silico* intestinal absorption analysis of all compounds shown values above 80% (84.81% - 100%), and most of the derivatives (8/14) exhibited good Caco-2 permeability, similar to itraconazole. Differently, Q1, Q7, H2, and H3 were not determined as P-glycoprotein substrates. No hydrazone derivative was suggested as inhibitor of P-glycoprotein I/II while Q9 was not assigned as a P-glycoprotein II inhibitor.

The volume of distribution (VDs) showed lower values (-0.807 and -0.169 log L/kg) for almost all derivatives. Likewise, low values were shown for the majority of them in regards to the unbound drug fraction (UF). However, H1, H2, H3, and Q8 compounds presented estimated values ranging from 0.274 to 0.386, above itraconazole (Table 6). In addition, the H3 was the only derivative with a suggested capability of blood-brain barrier permeability (BBB).

These compounds were also analyzed for interaction with CYP 450 enzymes, as substrates (2D6 and 3A4) or as inhibitors (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). The hydrazone derivatives were not substrates for CYP3A4, and none of them were substrates for CYP2D6. As inhibitors, only the H3 compound showed an inhibitory profile and only against CYP1A2. Q1, Q2, Q3, Q4 and Q10 compounds inhibit CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4. The candidates showed total clearance activity ranging from -0.926 log mL/min/kg to 0.786 log mL/min/kg. Similarly, we found no renal OCT2 substrate activity for both classes.

3. Discussion

The present work investigated *S. brasiliensis* isolates obtained from the lesions of domestic cats with sporotrichosis clinically classified as responsive or irresponsive to treatment with itraconazole, the last ones with episodes of relapse. This treatment varied from 2-60 months, and, as expected, *S. brasiliensis* showed MICs compatible with reduced sensitivity to itraconazole or “non-Wild Type”, whenever obtained from irresponsible cats, as proposed by ESPINEL-INGROFF and co-authors (2017) and Almeida-Paes and co-authors (2017). Cats mean age around three years-old is in accordance with previous reports on sporotrichosis as well as the predominance of males. Indeed, this species sexual maturity increases fighting for females and concomitant exposure to other diseased animals [1–3].

Although itraconazole is the first therapeutic option for human and domestic feline sporotrichosis treatment [8,10,19], broth microdilution cutoff points were not established. As a consequence, the definition of qualitative parameters of *Sporothrix* spp. response (sensitivity or resistance) to the different antifungal drugs remains a riddle to be solved. In an attempt to contribute to this definition, epidemiological cutoff values (ECVs) were suggested [19,20] though not yet fully correlated to the patients’ clinical responses [8,10,19]. Recently, Nakasu and co-authors (2020) published a single study describing solid efforts to draw a parallel between *in vitro* data and the feline therapeutic follow-up.

Recent publications suggest that ECVs with MICs in the 0.5-2mg/L range for itraconazole are considered indicative of *S. brasiliensis in vitro* sensitivity [8,10,19,20]. The present study data on *S. brasiliensis* clinical isolates supports this indication since those originated from domestic felines with an effective therapeutic response to the azole presented *in vitro* MIC of 2µg/mL. Contrarily, *S. brasiliensis* obtained from domestic feline showing poor therapeutic response to itraconazole, provided MIC values between 8 and 32 µg/mL, therefore considered “non-wild type” [19,20] or even resistant [8,10,11]. Likewise, Nakasu and co-authors (2020) in a veterinary hospital in Southern Brazil (Pelotas, RS), showed that about half of the investigated cats was irresponsible to itraconazole with MICs corresponding to *S. brasiliensis* resistance to this drug. However, the reported MICs for itraconazole detected in the present investigation were higher than those reported by these authors. This might reflect the fact that the South Region of Brazil is located 1800 km apart from the hyperendemic area (Rio de Janeiro, Southeast Brazil) with a lower level of sporotrichosis endemicity [1,3]

Several authors suggested that *S. brasiliensis* shows reduced sensitivity to azoles [8,10,19,20], revealing the pressing need to distinct therapeutic alternatives. In the recent years quinones became a target of several studies due to their diverse known biological activities, such as, antibacterial [21,22] and antifungal [23], they were also reported to have antifungal properties against *S. schenckii* [24]. The present study performed a analysis of new eleven quinone derivatives facing WT and NWT clinical isolates and the standard strain of *S. brasiliensis*. Quinonic derivatives Q1 and Q8 exhibited MIC and MFC values corroborating its potential for planning new antifungal molecules [23,24]. Indeed, Tandon and co-authors (2006), assessing quinone derivatives' antibacterial and antifungal potential, showed MICs between 6.25 - $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ for distinct *S. schenckii* isolates. Subsequently, the same authors [24] tested new naphthoquinone molecules against *S. schenckii*, and the MICs were between 0.78 - $\geq 50 \mu\text{g/mL}$. In the present study, the MICs obtained after *in vitro* challenging *S. brasiliensis* versus quinones, were higher than those reported for *S. schenckii* [24], but still compatible with future therapeutic potential. Our data are similar or even better than the *in vitro* activity of new dihydrofuranaphthoquinones molecules against *S. brasiliensis* and *S. schenckii* recently reported, with MICs ranging from 4-32 μM [13].

This study to prospect three hydrazones showed potential antifungal activity against different clinical isolates of *S. brasiliensis* and the standard strain. *In vitro* exposure to H1 provided MIC of 1 $\mu\text{g/mL}$ against the *S. brasiliensis* NWT1 while the corresponding itraconazole MIC was 32x higher. Remarkably, this isolated infected a domestic cat with a history of prolonged itraconazole irresponsive sporotrichosis and lesion recurrence on the base its amputated tail, due to this zoonosis. For the standard strain of *S. brasiliensis* (Sbra), the same hydrazone (H1) showed a promising *in vitro* result as the H3 molecule.

Indeed, the therapeutic potential for the chemical class of the hydrazones was previously reported, since they present several biological activities [25], including antimycotic against dimorphic fungi such as *Coccidioides posadasii* as well as highly relevant yeasts such *Candida* spp. and *Trichosporon asahii* in both community and hospital-acquired infections [25–28]. Cordeiro and co-authors (2016) considered higher MICs (31,2 - 250 $\mu\text{g/mL}$) facing *Coccidioides posadasii* as compatible with further research investment in hydrazones against this dimorphic fungus. Equally, distinct *Candida* species challenged to *in vitro* growth in the presence of different hydrazone derivatives provided MICs ranging from 0,25 - 128 $\mu\text{g/mL}$, thus reinforcing such potential [28]. Previously, Casanova and co-authors (2015) proposed that a MIC value between 8 - 32 $\mu\text{g/mL}$ could be considered an encouraging result after *in vitro* testing of new hydrazones against *Candida parapsilosis* and *Trichosporon asahii*. Together, our results point to this class as bearing strong potential for future investment as a new class to control fungal infections.

Crude extracts and essential oils are alternatives considered of great interest due to diverse biological activities, including antimicrobial activity against fungi of medical and veterinary importance [17], such as *S. schenckii* and *S. brasiliensis* [10,29]. The present study was the first to evaluate the potential antifungal properties of seven crude extracts from three different plant genus (*Ocotea*, *Myrciaria* and *Hypericum*) against clinical isolates of *S. brasiliensis*. The *Ocotea* extracts provided MICs and MFCs that can be interpreted as promising values and worth of future research investment. *O. notata* values were particularly interesting against the parasitic form of *S. brasiliensis*. The same observation was shown by Angels and co-authors (2020) for *Candida krusei* [30].

Myrciaria floribunda (H. West ex Willd.) O. Berg, a plant distributed from North to South Brazil is a native species of the Atlantic Rain Forest [31] Curiously, its extract was even more effective on *in vitro* inhibiting/killing yeast forms of *S. brasiliensis* NWTs isolates. On the other hand, *H. brasiliense* profile showed higher values, although still displaying a sensitivity profile compatible with future antifungal development. Indeed, the *Hypericum* genus composed by several metabolites, such as γ -pyrone and xanthenes, showed antifungal activity against the phytopathogen *Cladosporium cucumerinum* [32] and *Candida albicans* [33].

Few reports described the antifungal properties of plant origin compounds against *Sporothrix* spp., mainly concentrated in essential oils [17,29]. Cleff and collaborators (2008) considered promising *in vitro* results of the essential oil of *Origanum vulgare* against *S. schenckii* isolated from feline diseased domestic cats with MICs of 250 to 500 $\mu\text{g/mL}$ [17,29]. Another *in vitro* study conducted with extracts of *Origanum manjorana* (marjoram) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) against *S. brasiliensis* originated from animals residing in the Brazilian South Region, revealed MICs around 40 $\text{mg} / \text{mL}^{-1}$ [15]. In the present study, *in vitro* crude extracts showed even lower MICs against *S. brasiliensis* and, more importantly, MICs and MFCs were even lower for the yeast forms of the itraconazole resistant *S. brasiliensis*. Altogether, these results encourage new research efforts on natural compounds as important alternatives for feline sporotrichosis treatment.

Nevertheless, a limitation we acknowledge is the need for fractionation in order to determine the active metabolite for each investigated plant species extract. One hypothesis is the antifungal activity related to xanthenes or flavonoids as observed before for *C. albicans* [33–36] and *Cryptococcus neoformans* [37].

Hydrazones and quinones derivatives were submitted to *in silico* ADME/Tox properties analysis. Absorption is the process whereby the drug candidate moves from the point of administration (extravascular site) to the blood (systemic circulation). The values above 90%, presents an optimal intestinal profile [38]. Thereby all tested derivatives revealed a good theoretical absorption in the intestine, similar to itraconazole. Moreover, some quinone derivatives and itraconazole presented a permeability to Caco-2 cells. [39].

One last absorption parameter was analyzed by employing the P-glycoprotein transporters substrate or inhibitor [40]. The non-linear absorption kinetics of P-glycoprotein substrates has been reported due to saturation transporter-mediated efflux activity, promoting the inhibition of intestinal P-glycoprotein resulting in significant effects of drug interaction (DDI) [41,42]. The results were suggested that Q1, Q7, H2, and H3 derivatives compounds were not P-glycoprotein substrates suggesting a good *in silico* oral bio-availability for all analyzed derivatives to be further explored.

Volume of distribution (VDss), fraction unbound (human), and blood-brain barrier membrane (BBB) permeability were analyzed as a distribution parameter of all studied compounds. The VDss indicates the theoretical volume that a total dose would need to be uniformly distributed in the plasma at the same concentration observed in blood plasma. All compounds showed lower values of VDss suggesting that all these prototypes need low concentrations to remain in blood plasma. A fraction of the unbound drug of all hydrazones is higher than itraconazole. These results indicating these groups of molecules as a good predictive distribution because, the unbound form of the drug is responsible for exercising pharmacological activity [43]. The blood-brain barrier (BBB) was analyzed and according to SwissADME calculation, only H3 derivative could be passing through the blood-brain barrier.

Enzymatic metabolism indicates the chemical biotransformation of a drug in the body, which plays a vital role in converting drug compounds [42]. CYP enzymes represent the most studied phase I drug-metabolizing enzymes, and are also implicated in drug-drug interactions (DDIs) mediated by drug inhibition [44]. Despite none of the derivatives were substrate for tested Cytochrome P450 isozyme 2D6. All quinones are substrate of 3A4, likely itraconazole. Additionally, among these derivatives only H3 act as an inhibitor for CYP1A2. Interestingly, CYP1A2 is one main xenobiotic-metabolizing enzyme in humans, and a recent study associated this enzyme with the bioactivation of procarcinogens, including 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific and potent pulmonary carcinogen. [42,44].

Clearance is a constant that describes the relationship between drug concentration in the body. Important of determining elimination of the drug [45]. Except for hydrazones derivatives, all other new compounds designed exhibit-ed lowers values, such as itraconazole. These metabolic and excretion results indicated that theoretically the quinones

derivatives present a hepatic metabolization, while the hydrazones derivatives a renal metabolization.

Toxicity has been a significant concern to the safety of drug candidates. Hepatotoxicity is still one of the major problems of drug toxicity [46]. Consequently, only Q6, Q7, H1, and H3 derivatives showed no predicted hepatotoxicity. Concerning the *in silico* toxicity test of minnow, an equivalent lethal concentration value (LC50), representing the concentration of a molecule necessary to cause the death of 50% of experimentally tested Fathead Minnows, $LC50 < 0.5$ mM (i.e. $\log LC50 < -0.3$) are regarded to cause acute toxicity. Q6, Q7, H1, and H2 derivatives do not seem to present acute toxicity in the minnow test. All quinones, except Q8 and hydrazones, proved less toxic than itraconazole. No hydrazone was potentially inhibitor of HERG I and II channels [47], while quinones did not seem to inhibit HERG I. Avoiding patient fatal heart-beat problems and short QT syndrome.

The oral rat acute toxicity expresses the compound toxic potential in terms of the lethal dosage values (LD50 in mol/kg). These Chronic toxicity studies aim to detect the lowest doses of a compound that will cause LOAEL (the lowest observed adverse effects), and the treatment period and exposure time to the compound also have to be considered [48]. Log LOAEL pre-dicted values for our compounds suggest a larger dose of each compound has to be used to induce adverse effects, indicating safety for these compounds, comparing to itraconazole.

The ProTox-II propose to classify the drugs into several different steps, including a toxicological (immunotoxicity model), genotoxicological (cytotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity model) endpoints, and toxicity of specific protein target [49,50]. The *in silico* results revealed that all compounds present no cytotoxicity and carcinogenicity. In general, theoretical toxicity studies showed that the derivatives were less toxic than the antifungal of choice.

4. Materials and Methods

4.1. Fungal isolates

Six clinical *S. brasiliensis* isolates were obtained from the lesions of cats with laboratory-confirmed sporotrichosis, According to the evaluations performed by the veterinarians, six cats had lesions suspected of sporotrichosis, later confirmed by mycological culture isolation and genotyping of *Sporothrix brasiliensis*, all residing in the hyperendemic region of Rio de Janeiro, Brazil, as previously described [3]. These were selected from the Center for Microorganisms' Investigation fungal collection, based on the itraconazole *in vitro* results [51–53] following the criteria proposed by [19], as Wild Type ($MIC \leq 2\mu\text{g/mL}$) or non-Wild Type ($MIC \geq 4\mu\text{g/mL}$). These were further designated as "WT1", "WT2", "WT3" and "NWT1", "NWT2", "NWT3", respectively. The reference strain *S. brasiliensis* ATCC MYA-4823 (*Sbra*) was included in all experiments.

4.2. Growth conditions

The clinical isolates were maintained by cryopreservation in its yeast phase at -20°C in the fungus collection of the Center for Microorganism's Investigation (CIM) until its reactivation for the conduction of the experiments. For reactivation, cryotubes were defrosted with subsequent replication on Sabouraud agar 2% dextrose (Becton, Dickinson, and Company - BD, NJ, USA) and incubated at room temperature for five days for microbial growth in the form of conidia.

4.3. Synthetic Derivatives

Seventy-eight novel chemical derivatives of seven different classes (pyrazoles, pyrazolones, quinolones, naphthoquinones, hydrazones, n-phthalimides, and quinones) were screened by the disk diffusion antimicrobial sensitivity test (Kirby-Bauer methodology – adapted) [54]. The structure of the derivatives will not be disclosed due to patent possibilities.

4.4. Crude extracts

Seven different plant extracts were obtained from *Ocotea pulchella*, *Ocotea notata*, *Hypericum brasiliense*, and *Myrciaria floribunda* and further tested for the potential antifungal activity against all clinical isolates and the standard strain of *S. brasiliensis* (Sbra; Table 8). These crude extracts were provided by the Natural Products Technology Laboratory (LTPN), Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University. *O. notata*, *O. pulchella*, and *M. floribunda* were collected in the Restinga de Jurubatiba National Park (PNRJ), in the municipality of Carapebus (22° 13 '53 "S, 41° 35' 46" W), northern area of Rio de Janeiro state, Brazil. *Hypericum brasiliense* was obtained in the municipality of Trajano de Moraes (22° 12 '17' 'S, 43° 11' 35 " W), Mountain Region of the same state. The authorization for academic purposes collection, n° 13659-13, was issued by SisBio (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation, Ministry of Environment). All plant species were registered under n° A0D648D in the National System for the Management of Genetic Heritage and Traditional Knowledge (SISGEN).

Briefly, the collected plant materials were separately dried at 45 °C in an air circulation oven, subjected to grinding, and then extracted by maceration until depletion using 96% ethanol. After filtration, the solvents were evaporated under vacuum in a rotary evaporator, obtaining the crude ethanol extracts that were then lyophilized. Finally, each crude extract was resuspended and partitioned in solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol) to obtain the respective extracts.

Table 8. Taxonomic information on the crude extracts investigated and the respective diluents and deposit in the herbarium.

Scientific name	Family	Extracts / Fractions	Herbarium Deposit
<i>Ocotea pulchella</i>	<i>Lauraceae</i>	Ethanol; Dichloromethane; Ethyl acetate	RFFP 14500
<i>Ocotea notata</i>	<i>Lauraceae</i>	Ethyl acetate	RB 2300
<i>Hypericum brasiliense</i>	<i>Hypericaceae</i>	Hexane	RB 4837
<i>Myrciaria floribunda</i>	<i>Myrtaceae</i>	Dichloromethane	RFFP 13789

RFFP: Herbarium of the Faculty of Teacher Education, (State University of Rio de Janeiro, campus São Gonçalo / RJ), responsible: Dra. Ana Angélica Monteiro de Barros; RB: Herbarium of the Botanical Garden of Rio de Janeiro / RJ, responsible: Dra Rafaela Campostrini Forzza.

4.5. Antifungal susceptibility assays

Susceptibility testing was performed according to the standardized broth microdilution technique described by the CLSI in documents M38-A2 and M27-A3 [51,52] for yeast-like cells and conidia. The antifungal used as experimental control was itraconazole.

Minimum fungicidal concentrations (MFC) were used from subcultures on Petri dishes, including Sabouraud agar 2% dextrose (SDA; Becton, Dickinson and Company - BD, NJ, USA), filamentous phase, and Brain Heart Infusion (BHI; Becton, Dickinson and Company - BD, NJ, USA), yeast phase, with 30µL of the MIC cell suspension from wells that are not affected by visual impact. In plates, they were incubated at 25 °C for five days (conidia) and at 37 °C for seven days (yeast). After reading the number of colonies, the MFC was established as the lowest derivative concentration capable of eliminating 99.9% of the fungal growth [55].

Prototypes providing MICs under < 64 µg/mL against *S. brasiliensis* were considered promising candidates for future antifungal drug development. Three independent experiments were performed for all assays.

4.6. In silico toxicity and pharmacological profiles

In silico pharmacokinetic properties and toxicity estimations (ADMET) were evaluated using pkCSM - pharmacokinetic web server (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>) [48], OSIRIS Property Explorer [56] and SwissADME webserver [57]. These results were

compared with the itraconazole profile. The evaluated theoretical pharmacokinetic properties were absorption, distribution, metabolism, and excretion. Absorption suggests a theoretical human intestinal absorption due to the Caco-2 permeability, P-glycoprotein substrate, and P-glycoprotein I/II inhibition. For distribution, the theoretical steady-state volume of distribution was analyzed, the blood-brain barrier penetration (BBBP) and the fraction unbound to serum proteins in humans. The metabolism analyses were based in the relationships with Cytochrome P450 (CYP) enzymes: inhibition of CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9, and CYP2D6, and as substrate of CYP3A4 and CYP2D6. Lastly, excretion parameters were assessed by the total theoretical clearance and renal OCT2 substrate. Toxicological analyses comprise toxicity target, hepatotoxicity, hERGI/II inhibitors, and toxicity end points such as carcinogenic, mutagenic, immunotoxicity, and cytotoxicity parameters.

5. Conclusions

Three hydrazone derivatives (H1, H2 and H3) and crude extracts from *Ocotea notata* and *Myrciaria floribunda* *In vitro* results showed good performances against the yeast phase of *S. brasiliensis* itraconazole resistant isolates. Since sporotrichosis is a neglected zoonosis, currently spreading in Brazil and Latin America, the present data can contribute to its future control by alternative antifungal drug design against *S. brasiliensis*, the most virulent and prevalent species of the hyperendemic scenario.

Supplementary Materials: Table S1: Pharmacokinetics profile *in silico* of synthetic derivatives

Author Contributions: Conceptualization, A.R.S.B., R.L.D.M. and H.C.C.; methodology, A.R.S.B.; validation, L.C.S.V.S., L. M. A. and N. F. R.; formal analysis, A.R.S.B. and L.C.S.V.S.; investigation, L.C.S.V.S.; resources, A.R.S.B., L.R., R.L.D.M., R.B.G, D.S.O. and V.F.F.; data curation, A.R.S.B. and L.C.S.V.S.; writing—original draft preparation, L.C.S.V.S.; writing—review and editing, L.C.S.V.S., P.M.S., A.R.S.B., L.M.A. and H.C.C.; visualization, L.C.S.V.S.; supervision, A.R.S.B.; project administration, A.R.S.B.; funding acquisition, A.R.S.B. and R.L.D.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC-CNPq-UFF, Brazil); Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro, Brazil (FAPERJ - E-26/103.198/2011; E-26/010.001882/2014), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) – Financial Code 001.AMR as a fellowship of São Paulo Research Foundation, Brazil (FAPESP 2017/27265-5).

Institutional Review Board Statement: The study was approved by and conducted according to the norms of the Ethics Committee on Animal Use by the Fluminense Federal University, Rio de Janeiro / BR (CEUA-UFF, protocol number 208/2012; December 13th, 2012 and protocol number 7561040518; June 14th, 2018). The authorization for academic purposes collection, n^o 13659-13, was issued by SisBio (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation, Ministry of Environment). All plant species were registered under n^o A0D648D in the National System for the Management of Genetic Heritage and Traditional Knowledge (SISGEN).

Data Availability Statement: Any information requested to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the veterinarian collaborators and cat owners for allowing their animals to be part of this study. We thank Dr. Marcelo Guerra Santos, from the State University of Rio de Janeiro, Faculty of Teacher Education (Campus São Gonçalo/RJ), for the taxonomic identification of the plants, as well as the preparation of the exemplary exsiccata of each plant.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gremião; Miranda, L.H.M.; Reis, E.G.; Rodrigues, A.M.; Pereira, S.A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat

- to Human Transmission. *PLOS Pathog.* **2017**, *13*, e1006077, doi:10.1371/journal.ppat.1006077. 463
2. Gremião, E, M. da S. da R.; H, M.; AJB, C.; MO, X.; MR, de F.; F, M.; W, M.; RH, de M.A.P.; SA, P.; et al. 464
Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. 465
Braz. J. Microbiol. **2021**, *52*, 107–124, doi:10.1007/S42770-020-00365-3. 466
3. Macêdo-Sales, P.A.; Souto, S.R.L.S.; Destefani, C.A.; Lucena, R.P.; Machado, R.L.D.; Pinto, M.R.; Rodrigues, A.M.; 467
Lopes-Bezerra, L.M.; Rocha, E.M.S.; Baptista, A.R.S. Domestic feline contribution in the transmission of 468
Sporothrix in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. *BMC* 469
Vet. Res. **2018**, *14*, 19, doi:10.1186/s12917-018-1340-4. 470
4. Etchecopaz, A.N.; Scarpa, M.; Mas, J.; Cuestas, M.L. *Sporothrix brasiliensis*: A growing hazard in the Northern 471
area of Buenos Aires Province? *Rev. Argent. Microbiol.* **2020**, doi:10.1016/j.ram.2020.02.002. 472
5. Etchecopaz, A.N.; Lanza, N.; Toscanini, M.A.; Devoto, T.B.; Pola, S.J.; Daneri, G.L.; Iovannitti, C.A.; Cuestas, M.L. 473
Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro 474
susceptibility pattern to antifungal drugs. *J. Mycol. Med.* **2020**, *30*, 100908, doi:10.1016/j.mycmed.2019.100908. 475
6. Gremião, I.D.F.; Oliveira, M.M.E.; Monteiro de Miranda, L.H.; Saraiva Freitas, D.F.; Pereira, S.A. Geographic 476
Expansion of *Sporotrichosis*, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 621–624, doi:10.3201/eid2603.190803. 477
7. Brillhante, R.S.N.; Rodrigues, A.M.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G.; Pereira, S.A.; Gremião, I.D.F.; Schubach, T.M.P.; 478
de Camargo, Z.P. In vitro susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats 479
with sporotrichosis in Brazil: Table 1. *Med. Mycol.* **2016**, *54*, 275–279, doi:10.1093/mmy/myv039. 480
8. Nakasu, C.C.T.; Waller, S.B.; Ripoll, M.K.; Ferreira, M.R.A.; Conceição, F.R.; Gomes, A. dos R.; Osório, L. da G.; 481
de Faria, R.O.; Cleff, M.B. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* 482
infection. *Brazilian J. Microbiol.* **2020**, doi:10.1007/s42770-020-00290-5. 483
9. Pereira, S.A.; Schubach, T.M.P.; Gremião, I.D.F.; Silva, D.T. da; Figueiredo, F.B.; Assis, N.V. de; Passos, S.R.L. 484
Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Sci. Vet.* **2018**, *37*, 311, doi:10.22456/1679-9216.16781. 485
10. Waller, S.B.; Ripoll, M.K.; Madrid, I.M.; Acunha, T.; Cleff, M.B.; Chaves, F.C.; Roberto, J.; Mello, B. De; Faria, R.O. 486
De; Carlos, M.; et al. Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded 487
itraconazole formulations. **2020**. 488
11. Waller, S.B.; Dalla Lana, D.F.; Quatrin, P.M.; Ferreira, M.R.A.; Fuentesfria, A.M.; Mezzari, A. Antifungal resistance 489
on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian J. Microbiol.* **2020**, doi:10.1007/s42770-020-00307-z. 490
12. Forezi, L.S.M.; Borba-Santos, L.P.; Cardoso, M.F.C.; Ferreira, V.F.; Rozental, S.; Da Silva, F.D.C. Synthesis And 491
Antifungal Activity of Coumarins Derivatives against *Sporothrix* spp. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 492
doi:10.2174/1568026618666180221115508. 493
13. Garcia, P.F.; Pereira, L.B.-S.; Noronha, L.L.; Deckman, C.N.; Sá, M.H.Q.; Carvalho, F. da S.; Rozental, S.; Omena, 494
D.F.; Francisco, V.F. Synthesis, Stability Studies, and Antifungal Evaluation of Substituted α - and β -2,3- 495
Dihydrofuranaphthoquinones against *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii*. *Molecules* **2019**, *24*, 930, 496
doi:10.3390/molecules24050930. 497
14. Mathias, L.; Almeida, J.; Passoni, L.; Gossani, C.; Taveira, G.; Motta, V.G. and O. Antifungal activity of silver 498
salts of Keggin-type heteropolyacids against *Sporothrix* spp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *30*, 540–551, 499
doi:10.4014/JMB.1907.07064. 500
15. Waller, S.B.; Madrid, I.M.; Hoffmann, J.F.; Picoli, T.; Cleff, M.B.; Chaves, F.C.; De Faria, R.O.; Meireles, M.C.A.; 501
De Mello, J.R.B. Chemical composition and cytotoxicity of extracts of marjoram and rosemary and their activity 502
against *Sporothrix brasiliensis*. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 1076–1083, doi:10.1099/jmm.0.000517. 503
16. SB, W.; JF, H.; IM, M.; T, P.; MB, C.; FC, C.; RA, Z.; JRB, de M.; RO, de F.; MCA, M. Polar *Origanum vulgare* 504

- (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against *Sporothrix brasiliensis*. *Med. Mycol.* **2018**, *56*, 225–233, doi:10.1093/MMY/MYX031. 505
506
17. Cleff, M.B.; Meinerz, A.R.; Faria, R.O.; Xavier, M.O.; Santin, R.; Nascente, P.S.; Rodrigues, M.R.; Meireles, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* **2010**, *62*, 1291–1294, doi:10.1590/S0102-09352010000500040. 507
508
509
18. Waller, S.B.; Madrid, I.M.; Silva, A.L.; Dias de Castro, L.L.; Cleff, M.B.; Ferraz, V.; Meireles, M.C.A.; Zanette, R.; de Mello, J.R.B. In Vitro Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to Essential Oils of Lamiaceae Family. *Mycopathologia* **2016**, *181*, 857–863, doi:10.1007/s11046-016-0047-y. 510
512
19. Espinel-Ingroff, A.; Abreu, D.P.B.; Almeida-Paes, R.; Brilhante, R.S.N.; Chakrabarti, A.; Chowdhary, A.; Hagen, F.; Córdoba, S.; Gonzalez, G.M.; Govender, N.P.; et al. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, doi:10.1128/AAC.01057-17. 513
514
515
516
20. Almeida-Paes, R.; Brito-Santos, F.; Figueiredo-Carvalho, M.H.G.; Machado, A.C.S.; Oliveira, M.M.E.; Pereira, S.A.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Zancopé-Oliveira, R.M. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2017**, *112*, doi:10.1590/0074-02760160527. 517
518
519
520
21. Riffel, A.; Medina, L.F.; Stefani, V.; Santos, R.C.; Bizani, D.; Brandelli, A. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 811–818, doi:10.1590/S0100-879X2002000700008. 521
522
22. Tandon, V.K.; Chhor, R.B.; Singh, R. V.; Rai, S.; Yadav, D.B. Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1079–1083, doi:10.1016/j.bmcl.2004.01.002. 523
524
525
23. Louvis, A.D.R.; Silva, N.A.A.; Semaan, F.S.; Da Silva, F.D.C.; Saramago, G.; De Souza, L.C.S.V.; Ferreira, B.L.A.; Castro, H.C.; Salles, J.P.; Souza, A.L.A.; et al. Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones-green palladium-catalysed Suzuki cross coupling. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 7643–7656, doi:10.1039/c6nj00872k. 526
527
528
529
24. Tandon, V.K.; Maurya, H.K.; Mishra, N.N.; Shukla, P.K. Micelles catalyzed chemoselective synthesis “in water” and biological evaluation of oxygen containing hetero-1,4-naphthoquinones as potential antifungal agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6398–6403, doi:10.1016/j.bmcl.2011.08.095. 530
531
532
25. Chandra, S.; Vandana; Kumar, S. Synthesis, spectroscopic, anticancer, antibacterial and antifungal studies of Ni(II) and Cu(II) complexes with hydrazine carboxamide, 2-[3-methyl-2-thienyl methylene]. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *135*, 356–363, doi:10.1016/j.saa.2014.06.143. 533
534
535
26. Casanova, B.B.; Muniz, M.N.; De Oliveira, T.; De Oliveira, L.F.; Machado, M.M.; Fuentefria, A.M.; Gosmann, G.; Gnoatto, S.C.B. Synthesis and biological evaluation of Hydrazone derivatives as antifungal agents. *Molecules* **2015**, *20*, 9229–9241, doi:10.3390/molecules20059229. 536
537
538
27. Cordeiro, R. de A.; de Melo, C.V.S.; Marques, F.J. de F.; Serpa, R.; Evangelista, A.J. de J.; Caetano, E.P.; Mafezoli, J.; de Oliveira, M. da C.F.; da Silva, M.R.; Bandeira, T. de J.P.G.; et al. Synthesis and in vitro antifungal activity of isoniazid-derived hydrazones against *Coccidioides posadasii*. *Microb. Pathog.* **2016**, *98*, 1–5, doi:10.1016/j.micpath.2016.06.022. 539
540
541
542
28. Secci, D.; Bizzarri, B.; Bolasco, A.; Carradori, S.; D’Ascenzio, M.; Rivanera, D.; Mari, E.; Polletta, L.; Zicari, A. Synthesis, anti-Candida activity, and cytotoxicity of new (4-(4-iodophenyl)thiazol-2-yl)hydrazine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 246–253, doi:10.1016/j.ejmech.2012.04.006. 543
544
545
29. Cleff, M.B.; Meinerz, A.R.M.; Schuch, L.F.D.; Rodrigues, M.R.A.; Meireles, M.C.A.; Mello, J.R.B. Atividade in 546

- vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* **2008**, *60*, 547–548, doi:10.1590/S0102-09352008000200039. 548
30. Anjos, M.N.V.; Araújo-Neto, L.N. de; Buonafina, M.D.S.; Neves, R.P.; Souza, E.R. de; Bezerra, I.C.F.; Ferreira, M.R.A.; Soares, L.A.L.; Coutinho, H.D.M.; Martins, N.; et al. *Ocotea glomerata* (Nees) Mez Extract and Fractions: Chemical Characterization, Anti-Candida Activity and Related Mechanism of Action. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–12, doi:10.3390/ANTIBIOTICS9070394. 549–552
31. Tietbohl, L.A.C.; Barbosa, T.; Fernandes, C.P.; Santos, M.G.; Machado, F.P.; Santos, K.T.; Mello, C.B.; Araújo, H.P.; Gonzalez, M.S.; Feder, D.; et al. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *myrciaria floribunda* leaves on the development of *dysdercus peruvianus* and *oncopeltus fasciatus*. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2014**, *24*, 316–321, doi:10.1016/j.bjp.2014.07.009. 553–556
32. Rocha, L.; Marston, A.; Auxiliadora, M.; Kaplan, C.; Stoeckli-Evans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1381–1385, doi:10.1016/S0031-9422(00)89727-7. 557–559
33. Zubrická, D.; Mišianiková, A.; Henzelyová, J.; Valletta, A.; De Angelis, G.; D’Auria, F.D.; Simonetti, G.; Pasqua, G.; Čellárová, E. Xanthenes from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. *Plant Cell Rep.* **2015**, *34*, 1953–1962, doi:10.1007/s00299-015-1842-5. 560–563
34. Jin, Y.S. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126589. 564–565
35. Seleem, D.; Pardi, V.; Murata, R.M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. *Arch. Oral Biol.* **2017**, *76*, 76–83. 566–567
36. Souza-Moreira, T.M.; Severi, J.A.; Rodrigues, E.R.; de Paula, M.I.; Freitas, J.A.; Vilegas, W.; Pietro, R.C.L.R. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 2579–2582, doi:10.1080/14786419.2018.1460827. 568–570
37. Tocci, N.; D’Auria, F.D.; Simonetti, G.; Panella, S.; Palamara, A.T.; Debrassi, A.; Rodrigues, C.A.; Filho, V.C.; Sciubba, F.; Pasqua, G. Bioassay-guided fractionation of extracts from *Hypericum perforatum* in vitro roots treated with carboxymethylchitosans and determination of antifungal activity against human fungal pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *70*, 342–347, doi:10.1016/j.plaphy.2013.05.046. 571–574
38. Hadni, H.; Elhallaoui, M. 3D-QSAR, docking and ADMET properties of aurone analogues as antimalarial agents. *Heliyon* **2020**, *6*, e03580, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03580. 575–576
39. Ortiz, C.L.D.; Completo, G.C.; Nacario, R.C.; Nellas, R.B. Potential Inhibitors of Galactofuranosyltransferase 2 (GlfT2): Molecular Docking, 3D-QSAR, and In Silico ADMETox Studies. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–28, doi:10.1038/s41598-019-52764-8. 577–579
40. Deb, P.K.; Al-Attaqchi, O.; Prasad, M.R.; Tekade, R.K. Protein and Tissue Binding: Implication on Pharmacokinetic Parameters. In *Dosage Form Design Considerations: Volume I*; Elsevier, 2018; pp. 371–399 ISBN 9780128144244. 580–582
41. Mikov, M.; Đanić, M.; Pavlović, N.; Stanimirov, B.; Goločorbin-Kon, S.; Stankov, K.; Al-Salami, H. The Role of Drug Metabolites in the Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, *42*, 881–890, doi:10.1007/s13318-017-0417-y. 583–585
42. Correia, M.A.; Monteflano, P.R.O. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*; Ortiz de Montellano, P.R., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 177–259 ISBN 978-3-319-12107-9. 586–587
43. Moraes, A.D.T. de O.; Miranda, M.D.S. de; Jacob, Í.T.T.; Amorim, C.A. da C.; Moura, R.O. de; Silva, S.Â.S. da; 588

- Soares, M.B.P.; Almeida, S.M.V. de; Souza, T.R.C. de L.; Oliveira, J.F. de; et al. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 5388–5396, doi:10.1016/j.bmc.2018.07.024.
44. Nakajima, M.; Yoshida, R.; Shimada, N.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 1110–3.
45. Hu, B.; Joseph, J.; Geng, X.; Wu, Y.; Suleiman, M.R.; Liu, X.; Shi, J.; Wang, X.; He, Z.; Wang, J.; et al. Refined pharmacophore features for virtual screening of human thromboxane A2 receptor antagonists. *Comput. Biol. Chem.* **2020**, *86*, 107249, doi:10.1016/j.compbiolchem.2020.107249.
46. Björnsson, E.S. Hepatotoxicity by drugs: The most common implicated agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17020224.
47. Vedani, A.; Smiesko, M. In Silico Toxicology in Drug Discovery — Concepts Based on Three-dimensional Models. *Altern. to Lab. Anim.* **2009**, *37*, 477–496, doi:10.1177/026119290903700506.
48. Pires, D.E.V.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4066–4072, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
49. Drwal, M.N.; Banerjee, P.; Dunkel, M.; Wettig, M.R.; Preissner, R. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W53–W58, doi:10.1093/nar/gku401.
50. Banerjee, P.; Siramshetty, V.B.; Drwal, M.N.; Preissner, R. Computational methods for prediction of in vitro effects of new chemical structures. *J. Cheminform.* **2016**, *8*, 1–11, doi:10.1186/s13321-016-0162-2.
51. CLSI Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2008; ISBN 610.688.0700.
52. CLSI Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; 2nd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2008; ISBN 610.688.0700.
53. Oliveira, D.S. de Avaliação Clínico-Epidemiológica e Perfil de Sensibilidade a Antifúngicos de *Sporothrix brasiliensis* isolados a partir de felinos domésticos do Estado do Rio de Janeiro, Universidade Federal Fluminense - Faculdade de Farmácia, 2016.
54. Novais, J.S.; Rosandiski, A.C.; de Carvalho, C.M.; Silva, L.S.; Souza, L.C.S. V.; Santana, M. V.; Martins, N.R.C.; Castro, H.C.; Ferreira, V.F.; Gonzaga, D.T.G.; et al. Efficient Synthesis and Antibacterial Profile of Bis(2-hydroxynaphthalene-1,4-dione). *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20*, 121–131, doi:10.2174/1568026619666191210160342.
55. Borba-Santos, L.P.; Rodrigues, A.M.; Gagini, T.B.; Fernandes, G.F.; Castro, R.; de Camargo, Z.P.; Nucci, M.; Lopes-Bezerra, L.M.; Ishida, K.; Rozental, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med. Mycol.* **2015**, *53*, 178–188, doi:10.1093/mmy/myu056.
56. Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Reich, J.R.; Rufener, C. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 232–246, doi:10.1021/ci800305f.
57. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep42717.

Table S1: Pharmacokinetics profile in silico of synthetic derivatives

Compounds	Absorption					Distribution			Metabolism						Excretion		
	Intestinal absorption (human)	Caco-2 permeability	P-glycoprotein substrate	P-glycoprotein I inhibition	P-glycoprotein II inhibition	VDss (human)	Fraction unbounded	BBB permeability	Substrate		Inhibition				Total clearance	Renal OCT2 substrate	
									CYP								
	Numeric (%Absorbed)	Categorical (Yes/No)	Categorical (Yes/No)			Numeric (Log L/kg)	Numeric (Fu)	Categorical (Yes/No)	2D6	3A4	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4	Numeric (Log ml/min/kg)	Categorical (Yes/No)
Categorical (Yes/No)																	
Itra	100	Y	Y	Y	Y	-0.167	0.239	N	N	Y	N	Y	Y	N	Y	0.056	N
Q1	96.778	Y	N	Y	Y	-0.614	0	N	N	Y	N	Y	Y	N	Y	0.058	N
Q2	97.050	Y	Y	Y	Y	-0.515	0.04	N	N	Y	N	Y	Y	N	N	0.072	N
Q3	97.220	Y	Y	Y	Y	-0.595	0.053	N	N	Y	N	Y	Y	N	Y	0.057	N
Q4	88.680	N	Y	Y	Y	-0.807	0.184	N	N	Y	N	N	Y	N	Y	0.037	N
Q5	88.515	N	Y	Y	Y	-0.791	0.174	N	N	Y	N	N	Y	N	Y	0.098	N
Q6	97.451	Y	Y	Y	Y	-0.252	0.194	N	N	Y	N	N	Y	N	Y	0.039	N
Q7	100	Y	N	Y	Y	-0.312	0.153	N	N	Y	N	N	Y	N	Y	0.035	N
Q8	100	Y	Y	Y	Y	-0.347	0.274	N	N	Y	N	N	N	N	N	-0.926	N
Q9	84.812	Y	Y	Y	N	-0.187	0.029	N	N	Y	N	N	N	N	N	0.072	N
Q10	100	Y	Y	Y	Y	-0.574	0.196	N	N	Y	N	Y	Y	N	Y	-0.045	N
Q11	99.261	N	Y	Y	Y	-0.557	0.079	N	N	Y	N	N	Y	N	Y	-0.002	N
H1	99.261	N	Y	N	N	-0.317	0.286	N	N	N	N	N	N	N	N	0.786	N
H2	93.340	N	N	N	N	-0.231	0.386	N	N	N	N	N	N	N	N	0.726	N
H3	91.647	N	N	N	N	-0.169	0.324	Y	N	N	Y	N	N	N	N	0.285	N

Itra: itraconazole; VDss: volume of distribution; FU: fraction unbounded; BBB: blood brain barrier permeability; Y: yes; N: no; HERG I: Type 1 human ether-a-go-go-related gene; HERG II: Type 1 human ether-a-go-go-related gene.

4. ARTIGO 2

Three points of view on phendio, silver (I) and copper (II) 1,10-phenanthroline-5,6-dione against *Sporothrix brasiliensis*: an unprecedented report

O *Sporothrix brasiliensis* é um fungo termodimórfico, principal agente causador da esporotricose no Brasil que se mantém em constante expansão geográfica nesse país e também ultrapassando fronteiras continentais. O itraconazol é o medicamento de escolha para o tratamento de felinos e humanos, embora seja caro, difícil de ser administrado diariamente em gatos e com crescentes relatos de sensibilidade diminuída do *S. brasiliensis* a este azol. Afim de contribuir com possíveis novas alternativas terapêuticas, este artigo avaliou o potencial antifúngico dos novos compostos de 1,10 fenantrolina 5,6-diona por meio de testes *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de propriedades antifúngicas contra *S. brasiliensis* obtidos de gatos doentes da área hiperendêmica brasileira. Para isso, colaborações do Centro de Investigação de Microrganismos (CIM/UFF), coordenado pela Profa. Dra. Andrea Regina de Souza Baptista, foram feitas com os seguintes parceiros: Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (UFRJ), coordenado pelo Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos, o Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABIEMOL), coordenado pela Profa. Dra. Helena Carla Castro e o Departamento de Química, Universidade Nacional da Irlanda, Maynooth, Irlanda. Por fim, o manuscrito desse artigo deverá ser submetido até março do ano subsequente (2021) para revista científica Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Imprensa da Universidade de Oxford, Reino Unido - Fator de Impacto 5,439).

**Three points of view on phendio, silver (I) and copper (II) 1,10-phenanthroline-5,6-dione
against *Sporothrix brasiliensis*: an unprecedented report**

Lais Cavalcanti dos Santos Velasco de Souza*¹, Pãmella Antunes de Macêdo-Sales*¹, Nathália Faria Reis¹, Lucas Martins Alcântara¹, Lucieri Olegário Pereira Souza², Ricardo Luiz Dantas Machado¹, Reinaldo Barros Geraldo³, Malachy McCann⁴, André Luís Souza dos Santos², Helena Carla Castro³ e Andréa Regina Souza Baptista¹

¹ Center for Microorganisms' Investigation, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil.

² Laboratory of Advanced Studies of Emerging and Resistant Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Laboratory of Antibiotics, Biochemistry and Molecular Modeling, Institute of Biology, Fluminense Federal University- Niterói, RJ, Brazil.

⁴ Department of Chemistry, National University of Ireland, Maynooth, Ireland.

Corresponding author: Andrea Regina S. Baptista, Microorganisms Research Center (CIM), Biomedical Institute, Fluminense Federal University, Campus Valonguinho, Rua Outeiro São João Batista s/n, Fifth floor – Bloco E, Niterói, RJ, Brazil. – andrearegina@id.uff.br

Abstract

Sporothrix brasiliensis is responsible for the epizooty of this neglected subcutaneous mycosis with a hyperendemic status in Brazil, showing geographic expansion to other countries in South America. Itraconazole is the drug of choice for the treatment of feline sporotrichosis, however, it has some disadvantages such as: hepatotoxic potential, exclusive oral administration and high cost. This scenario shows the urgent need to seek new therapeutic alternatives. The 1,10-phenanthroline-5,6-dione is a phenanthrene-based compound, coupled or not to transition metal ions (Cu^{+2} , Ag^{+}) that previously demonstrated antimicrobial activities and pharmacological applications. Therefore, this work aimed at prospecting *in vitro*, *in vivo* and *in silico* 1,10-phenanthroline-5,6-dione antifungal properties against *S. brasiliensis* isolates from cats of the hyperendemic region. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the phendione and chelates, were determined using the broth microdilution method (M27-A3 and M38-A2). *Galleria mellonella* was the experimental model to the *in vivo* testing. *In silico* tests were used to predict the pharmacological profile and toxicity parameters of synthetic derivatives. Low MICs and MFCs were obtained for all drug candidates against conidia and yeasts of WT and NWT clinical isolates, ranging from 0,156 - 5 μM . *G. mellonella* larvae once treated with phenanthroline chelates presented an important increase in survival percentage (30-70%). Computational analysis did not show toxicity, while a good predictive pharmacological profile, with parameters similar to those of itraconazole. The three chelates are promising antifungal drugs, including inhibitory and fungicidal profiles against itraconazole-resistant *S. brasiliensis* from the Brazilian hyperendemics.

Keywords: Sporotrichosis, *Felis catus*, *Galleria mellonella*, Public Health, Treatment.

Introduction

Fungi that constitute the pathogenic clade of the *Sporothrix* genus [1,2] are responsible for cases of human and feline sporotrichosis worldwide [2,3]. *Sporothrix brasiliensis* is the species responsible for the epizootic of this neglected subcutaneous mycosis with a hyperendemic character in some Brazilian regions [4,5]. Itraconazole is the drug of choice for the treatment of feline sporotrichosis [5,6], however, it has some disadvantages such as: hepatotoxic potential, exclusive oral administration and high cost. These conditions make it even more difficult to treat and to control this zoonosis, which in some cases is prolonged, and adds important morbidity to the different hosts and considerable mortality to the diseased domestic feline [6].

In view of the limited therapeutic arsenal available against fungal diseases, whether due to the phenomena of microbial resistance or its limited bioavailability or toxicity to affected hosts, the need for alternative drugs to optimize such treatment is evident [7,8]. In this scenario, 1,10-phenanthroline-5,6-dione is a phenanthrene-based compound, coupled or not to transition metal ions (Cu^{+2} , Ag^{+}) that has already demonstrated antimicrobial activities and pharmacological applications [7–11], however, not yet investigated against *Sporothrix brasiliensis*.

For such investigation of the host-pathogen-compound interaction, a suitable experimental model is needed. Invertebrate models proved to be an alternative to assess the virulence of pathogenic fungi, since the immune system of insects has a close resemblance to innate mammalian immune response, both structurally and functionally [12,13]. In particular, *Galleria mellonella* has stood out as an alternative invertebrate model, being widely used in recent years in *in vivo* experimental infection for example *Candida haemulonii* and *Candida albicans* [16, 34]. The use of these larvae has become widespread due to their easy handling, low cost and large number of animals for generations. In addition, these insects have immune

system cells, hemocytes, similar to humans and are able to grow at 37 °C, perfectly mimicking physiology needs for the thermodimorphic *Sporothrix* conversion to the yeast phase [14,17].

To the best of our knowledge, this is the first work that aimed to evaluate the performance of the phendione and chelates (Cu^{+2} , Ag^{+}) *in vitro*, *in silico* and *in vivo* against the dimorphic fungus *S. brasiliensis*.

Material and Methods

Ethical Considerations

The study was approved and conducted in accordance with the rules of the Ethics Committee on Animal Use, Fluminense Federal University, Rio de Janeiro / BR (CEUA-UFF, protocol number 7561040518; June 14, 2018).

Strains and Culture Conditions

Six clinical isolates of *S. brasiliensis* obtained from the cutaneous lesions of six felines with laboratory-confirmed sporotrichosis, from hyperendemic regions of the state of Rio de Janeiro, Brazil, were selected, as described by previous work of the group [18]. The selection was based on the *in vitro* response criterion to itraconazole (Wild Type = MIC $\leq 2\mu\text{g/ml}$; Non-Wild Type = MIC $\geq 4\mu\text{g/ml}$) respecting the cutoff points suggested in the literature [19,20], further designated as “WT1”, “WT2”, “WT3” and “NWT1”, “NWT2”, “NWT3”, respectively. In addition, the reference strain of *S. brasiliensis* used in this work is an isolate of control of the American Type Culture Collection, ATCC MYA 4823.

The clinical isolates were maintained by cryopreservation in their filamentous phase at -20 °C in the fungal collection of the Center for Microorganisms' Research (CIM) of the Fluminense Federal University, until their reactivation for conducting the experiments. For

reactivation, cryotubes were thawed with subsequent replication in Sabouraud Agar (Becton, Dickinson and Company - BD, USA).

Chemistry

The 1,10-phenanthroline chelates used in the present study are: 1,10-phenanthroline-5,6-dione (Phendione), $[\text{Ag}(\text{phendio})_2]\cdot\text{ClO}_4$ (Ag-phendio) and $[\text{Cu}(\text{phendio})_3](\text{ClO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu-phendio), these were diluted in DMSO to 100% in the *in vitro* tests and 10% in the *in vivo* tests. These were prepared according to previous protocols [7,21].

***In vitro* Antifungal Sensitivity Assay**

The susceptibility test was performed according to the standardized broth microdilution technique, described by CLSI in documents M38-A2 and M27-A3 [22,23], for yeasts and conidia. The antifungal agent used as an experimental control was itraconazole (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

Minimal fungicidal concentrations (MFC) were performed from subcultures in Petri dishes, including 2% Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Becton, Dickinson and Company - BD, NJ, USA), filamentous phase and Brain Heart Infusion Broth (BHI; Becton, Dickinson and Company - BD, NJ, USA), yeast phase, with 10 μL of cell suspension from MIC wells unaffected by visual impact. The plates were incubated at 25 °C for five days (conidia) and at 37 °C for seven days (yeast). After reading the MFC was established as the lowest concentration of the derivative capable of eliminating 99.9% of the fungus growth [24]. According to Pfaller and coauthors (2004), we classified a molecule with a "fungicide" effect if its MFC was equal or up to 4x greater than its MIC whereas the "fungistatic" effect was determined whenever this value was greater than 4x the MIC [25].

Toxicity and *in silico* pharmacological profile

In silico pharmacokinetic properties and toxicity estimates (ADMET) of the three phenanthroline compounds were evaluated using pkCSM - pharmacokinetic web server (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>) [26], OSIRIS Property Explorer [27] and SwissADME webserver [28]. Results are also compared with the profiles of itraconazole and theoretical pharmacokinetic properties absorption, distribution, metabolism and excretion were evaluated. The parameters evaluated were human intestinal absorption (Caco-2 permeability), theoretical human intestinal absorption, P-glycoprotein substrate and inhibition of P-I / II glycoprotein. For distribution, the theoretical steady-state volume of distribution, the penetration of the blood-brain barrier (BBBP) and the non-protein bound serum fraction in humans were analyzed. Metabolism analyzes were performed by the relationship with Cytochrome P450 (CYP) enzymes as substrate of CYP3A4 and CYP2D6 and as inhibition of CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2D6. Analyzes of excretion parameters were performed on theoretical total clearance and renal OCT2 substrate. Toxicological analyzes included target toxicity, hepatotoxicity, hERG/II inhibitors, toxicity endpoints such as carcinogenic, mutagenic, immunotoxicity and cytotoxicity endpoints.

***Galleria mellonella* Survival Assays**

Infection of *Galleria mellonella* larvae was performed according to the previously standardized protocol for *Sporothrix* spp. and *Candida* spp. [15,16]. Larvae were selected in the sixth stage of development with 0.2 and 0.3g, uniform color, without spots or signs of melanization. Inoculation was done subcutaneously, using 10 μ L of inoculum with a Hamilton needle in the last left pro-leg. These were divided into three groups: 1- Ten larvae with 1×10^7 yeast/ μ L of *S. brasiliensis* ATCC MYA 4823 inoculum; 2- Ten larvae inoculated with PBS

(Phosphate Buffered Saline; FUJIFILM Irvine Scientific) and 3- Ten non-inoculated larvae (mechanical stress).

After inoculation, larvae groups were placed in 90 x 15 mm Petri dishes and incubated at 37°C. The status of the larvae was monitored daily for up to ten days to document the phenotypic changes, as well as the survival rates. Larvae were considered dead when no movement was noted after contact with a needle and intense melanization, as previously defined [15,29].

***In vivo* Antimicrobial Activity**

To evaluate the *in vivo* antimicrobial activity, one hour after larvae infection with *S. brasiliensis* ATCC MYA-4823, these were individually injected with 10 µL of the phenanthroline chelates and itraconazole at the concentration of 1X their respective MIC values. The three drug-free control groups were: 1- Non-inoculated larvae (mechanical stress); 2- 10 µL of PBS and 3-“non-injected” larvae group (fungus inoculated) [15]. Thus, a total of seven groups were formed, once considered: 4- phendione; 5- Cu⁺² phenanthroline; 6- Ag⁺ phenanthroline and 7- ITRA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), with ten injected larvae for each group [16].

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, in three independent experimental sets. Data were stored and analyzed using the Excel 2019 (Windows Server 2019), software (Microsoft, Albuquerque, Novo México -, EUA).

Results

Antifungal susceptibility assay

After initial screening by the disc-diffusion method, the compounds Phendione, Ag-phendio and Cu-phendio were selected to further investigation by the microdilution broth test against both morphotypes of *S. brasiliensis*. MIC and MFC values of the six clinical isolates and the standard strain against 1,10-phenantroline chelates and itraconazole are shown in Table 1

S. brasiliensis exposure to 1,10-phenantroline-5,6-dione and chelates provided low MIC values and MFC values for the conidial form, varying from 2.5 to 10 μM for WT and 1.25 to 5 μM for NWT isolates. The geometric mean of the MICs of these compounds against the NWT isolates compared to the WT was lower, however, when compared to the values obtained by the *S. brasiliensis* isolates against itraconazole, it was five times (5 \times) lower for WT and six times (6 \times) smaller for NWT (Table 2).

MIC values and MFC values for the phendione Ag-phendio e Cu-phendio from the clinical isolates in the parasitic form of *S. brasiliensis* were even lower, ranging from 0.312 to 2,5 μM against the WT and 0,156 to 2,5 μM for the NWT isolates (Table 1). MIC geometric means of these chelates for the parasitic form, compared to those for the antifungal of election, were about 3 \times smaller to the WT, while for the NWT it was approximately 25 \times smaller (Table 2).

The MFC of all molecules were equal to or double the MIC (Table 1), showing that these, from the *in vitro* methodology, have a fungicidal profile.

***In vivo* experiments**

G. mellonella larvae were infected with inoculum 10^7 the ATCC MYA 4823 *S. brasiliensis* (*S.bra*) and treated with the chelates at a dose equivalent to the *in vitro* MIC

profile. Phenotypic analysis (melanization, ability to move and survival) were carried out in order to assess the illness and death of insects.

All larvae of the control group (PBS) were alive and healthy throughout 10 days. Non inoculated larvae showed death by cannibalism (10%) (Figure 1). Larvae infected with a 10^7 *S. brasiliensis* inoculum showed 20% of death after 120 hours (fifth day) of inoculation (Figure 1). At the end of 10 days of incubation, about 90% of the larvae died. Sets of larvae with itraconazole treated after 1 hour of infection began to get sick and die from 144 hours after treatment (sixth day) (Figure 2). Deaths occurred gradually over the 6th, 7th and 8th day, culminating in 50% of surviving larvae (Figure 2).

After 120 hours (5 days) there was a 10% decline in survival of larvae treated with Phendione. During the 7th to 9th day there were about 30% more deaths, culminating at the end of the incubation days with 60% of intact larvae. Larvae treated with Ag-phendio became sick after 72 hours (third days) and after 144 hours (sixth days) of treatment 30% of larvae died. At the end of the survival assay, this chelate was able to inhibit the death of 30% of all larvae. Cu-phendio was able to protect the largest number of larvae observed in this test, with a total of 70% surviving larvae at the end of the incubation period (Figure 2). Importantly, there was an increase in the survival of larvae treated with Cu-phendio and Phendione, beginning in the eighth day (192 hours), compared to infected and no treatment larvae (Figure 2).

Toxicity and *in silico* pharmacological profile

ADMET analysis (absorption and distribution, metabolism, excretion) was performed in order to assess the pharmacological parameters of the 1,10-phenantroline-5,6-dione and chelates compared to itraconazole (Table 03).

The intestinal absorbance of all compounds showed values above 70% (71.60% - 86.70%) and the majority of all data pointed to a good skin permeability, comparable to itraconazole. None of the prototypes exhibited Caco-2 predictive permeability. Phendione was not seen as a substrate of P-glycoprotein while Ag-phendio and Cu-phendio chelates displayed a predictive inhibition profile and acted as P-glycoprotein I / II inhibitors.

Silver chelate had a lower theoretical value (-0.142 log L/kg) for volume of distribution (VD_{ss}), while all compounds separated an unbound drug fraction (UF), greater than itraconazole's, ranging from 0.381 to 0.662. Furthermore, no compound is able to predictively cross a blood-brain barrier (BBB).

In silico molecules predicted metabolism were obtained via interaction with CYP 450 enzymes, as substrates (2D6 and 3A4) or as inhibitors (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). No derivative is a substrate for a tested cytochrome P450 2D6 isozyme, however, Ag-phendio and Cu-phendio are substrates for 3A4, as is probably itraconazole. Furthermore, only Cu-phendio did not act as an inhibitor of CYP1A2 while all compounds acted as theoretical non-inhibitors for the other CYPs (2C19, 2C9, 2D6, 3A4). The Ag-phendio and Cu-phendio demonstrated total clearance activity ranging from -0.044 log ml/min/kg to 1,018 log ml/min/kg. Likewise, only chelates exhibited theoretical activity to the renal OCT2 substrate.

Toxicity was predicted as described in Table 4 and 5. The oral rat acute toxicity (LD₅₀) of all derivatives and itraconazole ranged from 2.349 mol/kg to 2.966 mol/kg. In contrast, oral rat chronic toxicity (LOAEL) varied from 0,055 log mg/kg bw/day to 1.088 mg/kg bw/day. Minnow toxicity varied between -4.446 log LC₅₀ to 13.167 log LC₅₀. All chelates exhibited a value of 0.285 log ug/L for *P. piriform* toxicity. The chelates did not show evidence of a hepatotoxic effect while the antifungal of choice, exhibited (Table 4).

The *in silico* predictions of four toxicological endpoints revealed that Phendione has a possible carcinogenic and mutagenic effect. O Ag-phendio e o Cu-phendio did not exhibit possible toxicological effects for the evaluated parameters similar to itraconazole (Table 5).

Discussion

Sporotrichosis is a disease of great concern and interest in public health, especially in Latin America where it reaches endemic proportions. Since few antimicrobial agents are available for its treatment, studies of new therapeutic options are crucial to fight this hyperendemic zoonosis [2,5]. In this study we investigated clinical isolates of *S. brasiliensis* from domestic cats with sporotrichosis *in vitro* determined as sensitive (WT) or resistant (NWT) to itraconazole. As a matter of fact two animals presented relapse episodes and the carrier of the NWT1 isolate recently showed a lesion on the tail amputation scar, providing a fifth episode with the isolation of *S. brasiliensis*. Phenanthrolines have been the subject of several studies in recent decades due to their chemotherapy potential, in addition to several other biological activities [7,30–32], including a vast antimicrobial potential [8,16,33,34].

The present study investigated *in vitro*, *in vivo* and *in silico* potential antifungal properties of three 1:10 phenanthroline chelates against *S. brasiliensis*, the major hyperendemic sporotrichosis zoonotic species. These molecules showed promising results, exhibiting lower geometric means MIC values, 25× smaller than those for itraconazole against parasitic form of *S. brasiliensis* NWT (itraconazole “resistant”) isolates. MFCs obtained in this study, for both morphotypes against clinical isolates WT and NWT were equal to or 2× higher compared to MIC values, revealing a fungicidal effect for these molecules [25]. Relevant result because currently, the drugs commonly used for the treatment of sporotrichosis are fungistatic [6]. The same phenanthroline chelates were investigated against

Phialophora verrucosa, one of the major chromoblastomycosis agent, obtaining higher MIC values ranging from 2.5 to 5 mg/L [8]. Other authors challenged *Candida albicans* with the same compounds, showing MIC values ranging from 1.25 to 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ [33]. Recently, Gandra *et al.* (2017) evaluated the antifungal profile of several 1,10-phenanthroline derivatives, including as used in this study, against *Candida haemulonii* isolates and obtained IC50 ranging from 0.36 to 0.77 mg/L [7], corroborating the antifungal potential of these chemical class. Ag-phendio and Cu-phendio compounds showed promising antifungal properties against *S. brasiliensis*, as described for both pathogenic yeast [7,33] and filamentous fungi [8]. Metallic ions, mainly containing transition metals, were noticed before as chelates of important biological activity [35,36].

The similarity between the insect immune response and the innate immune response of mammals has led to an exponential increase in the use of the *in vivo* experimental model, *Galleria mellonella*. This insect perfectly matches the needs to investigate antimicrobial properties of new drug candidates, by allowing the interaction of the pathogen with the host's immune response along with the compound, among other possibilities [13]. Silva *et al.* (2018), for example, evaluated the efficacy of classic antifungals in *Galleria mellonella* infection with clinical isolates of *Candida haemulonii*. Clavijo-Giraldo *et al* (2016) also used this insect to analyze the virulence of isolates from *S. brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*. The *in vivo* results of the present study reaffirmed the great potential of 1,10 phenantroline chelates against *S. brasiliensis*, as already mentioned in the literature for other microorganisms such as *C. albicans*, *C. haemulonii* and *P. verrucosa* [8,16,34]. Phendione and Cu-phendio were able to increase the percentage of survival of infected larvae (60% and 70% survival, respectively), corroborating 1,10-phenantroline derivatives promote a protective effect against fungal infections as previously reported [16,34].

After *in silico* analysis of the molecules we observed that all molecules showed good theoretical absorption in the intestine, similar to itraconazole. An important result, as the ability to overcome the intestinal epithelial barrier is important in the study of possible molecules with oral bioavailability [37]. Predictive evaluation of the Caco-2 model parameter [38] was also evaluated and no compound showed theoretical permeability to these cells [39]. However, all phenanthrolines had theoretical permeability to exceed the skin, an interesting feature from the suggestion of a possible prototype for topical use [40]. Phendio was not seen as a substrate of p-glycoprotein while Ag-phendio and Cu-phendio showed a predictive inhibition profile, relevant parameter in drug interactions. The p-glycoprotein (gp-P) transporter is the product of the multidrug resistance gene capable of modulating the oral bioavailability of a drug, soon, when drugs act as P-gp inhibitors, there is an increase in their substrates in the intracellular environment, due to the decrease in the efflux transport of these molecules. [41,42].

Volume of distribution (VD_{ss}), fraction unbound (human), and blood-brain barrier membrane (BBB) permeability were analyzed as a distribution parameter of all studied compounds. Only Ag-phendio had a lower theoretical value compared to itraconazole suggesting that this prototype needs low concentrations to remain in blood plasma. All compounds presented an unbound fraction of the drug, which was higher compared to itraconazole, an important result because the unbound form of the drug is usually responsible for the exercise of pharmacological activity while the fraction bounded to plasma proteins is inactive [43]. The blood-brain barrier (BBB) was analyzed and no compound is able to cross the blood-brain barrier predictively. This is an important result because it entails a lower possibility of toxic damage to the brain and the bloodstream once the 1.10 phenanthroline chelates are metabolized [39].

CYP proteins represent the most studied phase I drug metabolizing enzymes, which promote the oxidation of various compounds involved in numerous physiological processes and [44] are implicated in drug-inhibition-mediated drug interactions (DDIs) [45]. Here, no derivative is a predicted substrate for the cytochrome P450 isozyme 2D6 tested, however, both chelates are substrates for 3A4, as is probably itraconazole. Furthermore, among these derivatives, only Cu-phendio did not act as an inhibitor of CYP1A2 whereas the other two compounds acted as theoretical non-inhibitors for the other CYPs (2C19, 2C9, 2D6, 3A4). No molecule was predicted as a substrate for the cytochrome P450 isoenzyme 2D6 tested, however, both Ag-phendio and Cu-phendio are substrates for 3A4, equal to itraconazole predictively. Relevant data because the CYP proteins represent the most studied phase I drug metabolizing enzymes, which promote the oxidation of various compounds involved in numerous physiological processes and [44] are implicated in drug-inhibition-mediated drug interactions (DDIs) [45].

Clearance is a constant that describes the relationship between drug concentration in the body and drug clearance rate. [46]. Only copper chelate exhibited lower values, such as itraconazole revealing, in a predictive way, that it presents hepatic metabolism, while silver chelate and phendio present possible renal metabolization.

The 1,10-phenantroline-5,6-dione and chelates did not show acute toxicity in the Minnow toxicity test. Furthermore, they were shown to be less toxic compared to itraconazole from the predicted analysis of log LOAEL [26]. Relevant toxicological results suggest that these molecules to induce adverse effects require a higher dose. Resulting relevant as it indicates a large expected safety margin for these prototypes.

Phendione, Ag-phendio and Cu-phendio not demonstrated a possible hepatotoxic effect, cytotoxicity, immunocytotoxicity, on the contrary itraconazole. However, only Phendione exhibited a possible carcinogenic and mutagenic effect, In general, theoretical

toxicity studies showed that the derivatives were less toxic than the antifungal of choice with results similar to other studies of different molecules [47,48].

The three 1,10 phenatrolin derivatives showed promising performances against both saprophytic and parasitic phases of *S. brasiliensis*, including itraconazole resistant isolates from the Brazilian hyperendemics. However, a limitation we acknowledge is the lack of complete correspondence between vertebrates and invertebrates. Further studies with vertebrate models should be conducted in order to prove these compounds and antifungal drugs. We believe that this study offers important data on alternative molecules for the future treatment of this neglected zoonosis that is currently expanding to several Brazilian regions and also in South America.

Reference

1. de Beer, Z.W.; Duong, T.A.; Wingfield, M.J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Stud. Mycol.* **2016**, *83*, 165–191, doi:10.1016/j.simyco.2016.07.001.
2. Rodrigues, A.M.; Della Terra, P.P.; Gremião, I.D.; Pereira, S.A.; Orofino-Costa, R.; de Camargo, Z.P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia* 2020.
3. Etchecopaz, A.N.; Scarpa, M.; Mas, J.; Cuestas, M.L. *Sporothrix brasiliensis*: A growing hazard in the Northern area of Buenos Aires Province? *Rev. Argent. Microbiol.* **2020**, doi:10.1016/j.ram.2020.02.002.
4. Gremião, I.D.F.; Oliveira, M.M.E.; Monteiro de Miranda, L.H.; Saraiva Freitas, D.F.; Pereira, S.A. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 621–624, doi:10.3201/eid2603.190803.
5. Gremião, I.D.F.; E, M. da S. da R.; H, M.; AJB, C.; MO, X.; MR, de F.; F, M.; W, M.; RH, de M.A.P.; SA, P.; et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Braz. J. Microbiol.* **2021**, *52*, 107–124, doi:10.1007/S42770-020-00365-3.
6. Pereira, S.A.; Schubach, T.M.P.; Gremião, I.D.F.; Silva, D.T. da; Figueiredo, F.B.; Assis, N.V. de; Passos, S.R.L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Sci. Vet.* **2018**, *37*, 311, doi:10.22456/1679-9216.16781.
7. Gandra, R.M.; Mc Carron, P.; Fernandes, M.F.; Ramos, L.S.; Mello, T.P.; Aor, A.C.; Branquinha, M.H.; McCann, M.; Devereux, M.; Santos, A.L.S. Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1257,

- doi:10.3389/fmicb.2017.01257.
8. Granato, M.Q.; Gonçalves, D. de S.; Seabra, S.H.; McCann, M.; Devereux, M.; dos Santos, A.L.S.; Kneipp, L.F. 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based compounds are effective in disturbing crucial physiological events of *Phialophora verrucosa*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.00076.
 9. Mutlu, H.G. New heteroleptic Cu(II) complexes of chrysin with 2,2'-bipyridine and substituted 1,10-phenanthrolines: Synthesis, characterization, thermal stability and antioxidant activity. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1209*, 127917, doi:10.1016/j.molstruc.2020.127917.
 10. Deegan, C.; McCann, M.; Devereux, M.; Coyle, B.; Egan, D.A. In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), [Ag₂(phen)₃(mal)] · 2H₂O, [Cu(phen)₂(mal)] · 2H₂O and [Mn(phen)₂(mal)] · 2H₂O (malH₂ = malonic acid) using human cancer cells. *Cancer Lett.* **2007**, *247*, 224–233, doi:10.1016/j.canlet.2006.04.006.
 11. Rigo, G. vargas; Petro-Silveira, B.; Devereux, M.; McCann, M.; Souza dos Santos, A.L.; Tasca, T. Anti- *Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology* **2019**, *146*, 1179–1183, doi:10.1017/S003118201800152X.
 12. Pereira, T.C.; Barros, P.P. de; de Oliveira Fugisaki, L.R.; Rossoni, R.D.; Ribeiro, F. de C.; Menezes, R.T. de; Junqueira, J.C.; Scorzoni, L. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J. Fungi* **2018**, *4*.
 13. Piatek, M.; Sheehan, G.; Kavanagh, K. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying *in vivo* activity of conventional and novel antimicrobial agents. *Pathog. Dis.* **2020**, *78*, doi:10.1093/FEMSPD/FTAA059.

14. Lozoya-Pérez, N.E.; Clavijo-Giraldo, D.M.; Martínez-Duncker, I.; García-Carnero, L.C.; López-Ramírez, L.A.; Niño-Vega, G.A.; Mora-Montes, H.M. Influences of the Culturing Media in the Virulence and Cell Wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. *J. Fungi* **2020**, *6*, 1–21, doi:10.3390/JOF6040323.
15. Clavijo-Giraldo, D.M.; Matínez-Alvarez, J.A.; Lopes-Bezerra, L.M.; Ponce-Noyola, P.; Franco, B.; Almeida, R.S.; Mora-Montes, H.M. Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *122*, 73–77, doi:10.1016/j.mimet.2016.01.014.
16. Gandra, R.M.; McCarron, P.; Viganor, L.; Fernandes, M.F.; Kavanagh, K.; McCann, M.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S.; Howe, O.; Devereux, M. In vivo Activity of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against *Candida haemulonii* Using the *Galleria mellonella* Model. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1–15, doi:10.3389/fmicb.2020.00470.
17. Singulani, J.L.; Scorzoni, L.; de Oliveira, H.C.; Marcos, C.M.; Assato, P.A.; Fusco-Almeida, A.M.; Mendes-Giannini, M.J.S. Applications of invertebrate animal models to dimorphic fungal infections. *J. Fungi* **2018**, *4*, doi:10.3390/jof4040118.
18. Macêdo-Sales, P.A.; Souto, S.R.L.S.; Destefani, C.A.; Lucena, R.P.; Machado, R.L.D.; Pinto, M.R.; Rodrigues, A.M.; Lopes-Bezerra, L.M.; Rocha, E.M.S.; Baptista, A.R.S. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 19, doi:10.1186/s12917-018-1340-4.
19. Espinel-Ingroff, A.; Abreu, D.P.B.; Almeida-Paes, R.; Brilhante, R.S.N.; Chakrabarti, A.; Chowdhary, A.; Hagen, F.; Córdoba, S.; Gonzalez, G.M.; Govender, N.P.; et al. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular

- Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, doi:10.1128/AAC.01057-17.
20. Almeida-Paes, R.; Brito-Santos, F.; Figueiredo-Carvalho, M.H.G.; Machado, A.C.S.; Oliveira, M.M.E.; Pereira, S.A.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Zancopé-Oliveira, R.M. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2017**, *112*, doi:10.1590/0074-02760160527.
 21. Casey, M.T.; McCann, M.; Devereux, M.; Curran, M.; Cardin, C.; Convery, M.; Quillet, V.; Harding, C. Synthesis and structure of the MnII,II complex salt [Mn₂(η¹η¹μ²-oda)(phen)₄(H₂O)₂][Mn₂](Mn₂(η¹η¹μ²-oda)(phen)₄(η¹-oda)₂].4H₂O (odah₂ = octanedioic acid)... *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2643–2645, doi:10.1039/C39940002643.
 22. CLSI *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*; 2nd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2008; ISBN 610.688.0700.
 23. CLSI *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2008; ISBN 610.688.0700.
 24. Borba-Santos, L.P.; Rodrigues, A.M.; Gagini, T.B.; Fernandes, G.F.; Castro, R.; de Camargo, Z.P.; Nucci, M.; Lopes-Bezerra, L.M.; Ishida, K.; Rozental, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med. Mycol.* **2015**, *53*, 178–188, doi:10.1093/mmy/myu056.
 25. Pfaller, M.A.; Sheehan, D.J.; Rex, J.H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 268, doi:10.1128/CMR.17.2.268-280.2004.

26. Pires, D.E.V.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4066–4072, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
27. Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Reich, J.R.; Rufener, C. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 232–246, doi:10.1021/ci800305f.
28. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep42717.
29. Champion, O.L.; Titball, R.W.; Bates, S. Standardization of *G. mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. *J. Fungi* **2018**, *4*.
30. Obalı, A.Y.; Akçaalan, S.; Arslan, E.; Obalı, İ. Antibacterial activities and DNA-cleavage properties of novel fluorescent imidazo-phenanthroline derivatives. *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, 103885, doi:10.1016/j.bioorg.2020.103885.
31. Papadia, P.; Margiotta, N.; Bergamo, A.; Sava, G.; Natile, G. Platinum(II) Complexes with Antitumoral/Antiviral Aromatic Heterocycles: Effect of Glutathione upon in Vitro Cell Growth Inhibition. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3364–3371, doi:10.1021/jm0500471.
32. Heffeter, P.; Jakupec, M.A.; Körner, W.; Chiba, P.; Pirker, C.; Dornetshuber, R.; Elbling, L.; Sutterlüty, H.; Micksche, M.; Keppler, B.K.; et al. Multidrug-resistant cancer cells are preferential targets of the new antineoplastic lanthanum compound KP772 (FFC24). *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1873–1886, doi:10.1016/j.bcp.2007.03.002.
33. McCann, M.; Geraghty, M.; Devereux, M.; O’Shea, D.; Mason, J.; O’Sullivan, L. Insights Into the Mode of Action of the Anti-*Candida* Activity of 1,10-Phenanthroline

- and its Metal Chelates. *Met. Based. Drugs* **2000**, *7*, 185–193, doi:10.1155/MBD.2000.185.
34. Rowan, R.; Moran, C.; McCann, M.; Kavanagh, K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. *BioMetals* **2009**, *22*, 461–467, doi:10.1007/s10534-008-9182-3.
35. Rocha, D.P.; Ferreira Pinto, G.; Ruggiero, R.; De Oliveira, C.A.; Guerra, W.; Soares Fontes, A.P.; Tavares, T.T.; Marzano, I.M.; Pereira-Maia, E.C. Coordination of metals to antibiotics as a strategy to combat bacterial resistance. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 111–118.
36. Zanvettor, N.T. Complexos Metálicos de Pt(II), Pd(II) E Ag(I) Com o Ligante 2-Tiofen-2, Universidade Estadual De Campinas, 2016.
37. Caldwell, G.; Yan, Z.; Tang, W.; Dasgupta, M.; Hasting, B. ADME Optimization and Toxicity Assessment in Early- and Late-Phase Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 965–980, doi:10.2174/156802609789630929.
38. Pham The, H.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.; Mangas Sanjuan, V.; Centelles, I.; Garrigues, T.M.; Cabrera-Pérez, M.Á. In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. *Mol. Inform.* **2011**, *30*, 376–385, doi:10.1002/minf.201000118.
39. Ortiz, C.L.D.; Completo, G.C.; Nacario, R.C.; Nellas, R.B. Potential Inhibitors of Galactofuranosyltransferase 2 (GlFT2): Molecular Docking, 3D-QSAR, and In Silico ADMETox Studies. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–28, doi:10.1038/s41598-019-52764-8.
40. Alonso, C.; Carrer, V.; Espinosa, S.; Zanuy, M.; Córdoba, M.; Vidal, B.; Domínguez, M.; Godessart, N.; Coderch, L.; Pont, M. Prediction of the skin permeability of topical drugs using in silico and in vitro models. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *136*, 104945, doi:10.1016/j.ejps.2019.05.023.

41. Riede, J.; Umehara, K.I.; Schweigler, P.; Huth, F.; Schiller, H.; Camenisch, G.; Poller, B. Examining P-gp efflux kinetics guided by the BDDCS – Rational selection of in vitro assay designs and mathematical models. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *132*, 132–141, doi:10.1016/j.ejps.2019.03.005.
42. Correia, M.A.; Monteflano, P.R.O. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*; Ortiz de Montellano, P.R., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 177–259 ISBN 978-3-319-12107-9.
43. Deb, P.K.; Al-Attraqchi, O.; Prasad, M.R.; Tekade, R.K. Protein and Tissue Binding: Implication on Pharmacokinetic Parameters. Implication on Pharmacokinetic Parameters. In *Dosage Form Design Considerations: Volume I*; Elsevier, 2018; pp. 371–399 ISBN 9780128144244.
44. Mikov, M.; Đanić, M.; Pavlović, N.; Stanimirov, B.; Goločorbin-Kon, S.; Stankov, K.; Al-Salami, H. The Role of Drug Metabolites in the Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, *42*, 881–890, doi:10.1007/s13318-017-0417-y.
45. Bode, C. The nasty surprise of a complex drug-drug interaction. *Drug Discov. Today* 2010, *15*, 391–395.
46. Hu, B.; Joseph, J.; Geng, X.; Wu, Y.; Suleiman, M.R.; Liu, X.; Shi, J.; Wang, X.; He, Z.; Wang, J.; et al. Refined pharmacophore features for virtual screening of human thromboxane A2 receptor antagonists. *Comput. Biol. Chem.* **2020**, *86*, 107249, doi:10.1016/j.compbiolchem.2020.107249.
47. Banerjee, P.; Siramshetty, V.B.; Drwal, M.N.; Preissner, R. Computational methods for prediction of in vitro effects of new chemical structures. *J. Cheminform.* **2016**, *8*, 1–11, doi:10.1186/s13321-016-0162-2.
48. Drwal, M.N.; Banerjee, P.; Dunkel, M.; Wettig, M.R.; Preissner, R. ProTox: a web

server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W53–W58, doi:10.1093/nar/gku401.

Table 01: *In vitro* susceptibility (μM) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (conidial and yeast form) planktonic cells to 1,10 phenanthroline-5,6 dione.

Azole/ 1,10 -Phenantroline-5,6 dione		ATCC/ Clinical Isolates (μM)													
		<i>S.bra</i>		WT1		WT2		WT3		NWT1		NWT2		NWT3	
		C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y	C	Y
Itraconazole	MIC	1	2	16	1	16	4	16	1	32	32	16	16	16	8
	MFC	8	16	64	8	32	32	64	8	64	>128	64	128	32	128
1,10-phenantroline-5,6-dione (phendione)	MIC	5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	MFC	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5
[Ag(phendio) ₂](ClO ₄) ₂ (Ag-phendio)	MIC	2,5	0,312	2,5	0,625	2,5	0,312	2,5	0,312	2,5	0,625	1,25	0,156	5	0,625
	MFC	5	0,312	10	1,25	2,5	0,312	5	0,625	5	1,25	2,5	0,312	5	0,625
[Cu(phendio) ₃](ClO ₄) ₂ .4H ₂ O (Cu-phendio)	MIC	5	0,625	2,5	2,5	2,5	0,625	5	0,625	5	1,25	2,5	0,312	5	1,25
	MFC	5	0,625	10	2,5	5	0,625	5	0,625	5	2,5	5	0,312	5	2,5

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration; C: conidia;

Y: yeast.

Table 02: Geometric means generated from the *in vitro* susceptibility (μM) of the six isolated *Sporothrix brasiliensis* (yeast form and conidial form) planktonic cells to 1,10 phenanthroline-5,6 dione.

Azole/ 1,10 -Phenantroline-5,6 dione		ATCC / Clinical Isolates (μM)					
		<i>S.bra</i> (C)	<i>S.bra</i> (Y)	WT GM (C)	WT GM (Y)	NWT GM (C)	NWT GM (Y)
Itraconazole	MIC	1	2	16	2	21,3	18,7
	MFC	8	16	53,3	16	53,3	128
1,10-phenantroline-5,6- dione (phendione)	MIC	5	2,5	2,5	0,83	3,33	0,83
	MFC	5	2,5	5	0,83	5	0,83
[Ag(phendio) ₂] ClO ₄ (Ag-phendio)	MIC	2,5	0,312	2,5	0,416	3	0,468
	MFC	5	0,312	5,83	0,729	4,1	0,729
[Cu(phendio) ₃] (ClO ₄) ₂ .4H ₂ O (Cu-phendio)	MIC	5	0,625	3,33	1,25	4,1	0,937
	MFC	5	0,625	6,67	1,25	5	1,77

Sbra: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4823); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicidal Concentration; GM: Geometric Mean C: conidia; Y: yeast.

Table 03: *In silico* pharmacokinetic profile of the 1,10 phenanthroline-5,6 dione.

Azole/ 1,10 - Phenanthroline -5,6 dione	Absorption						Distribution			Metabolism							Excretion	
	Intestinal absorption (human)	Skin permeability	Caco-2 permeability	P- glycoprotein substrate	P- glycoprotein I inhibition	P- glycoprotein II inhibition	VDss (human)	Fraction unbounded	BBB permeability	Substrate	Inhibition						Total clearance	Renal OCT2 substrate
										CYP								
	Numeric (% Absorbed)	Categorical (Yes/No)	Categorical (Yes/No)	Categorical (Yes/No)			Numeric (Log L/kg)	Numeric (Fu)	Categorical (Yes/No)	2D6	3A4	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4	Numeric (Log ml/min/kg)	Categorical (Yes/No)
Itra	100	Yes	Yes	Y	Y	Y	-0.167	0.239	N	N	Y	N	Y	Y	N	Y	0.056	N
Phendione	71.603	Yes	No	N	N	N	0.552	0.662	N	N	N	Y	N	N	N	N	1.018	N
Ag-phendio	93.629	Yes	No	Y	Y	Y	-0.142	0.397	N	N	Y	Y	N	N	N	N	0.516	Y
Cuphendio	96.707	Yes	No	Y	Y	Y	0.011	0.381	N	N	Y	N	N	N	N	N	-0.044	Y

Itra: itraconazole; VDss: distribution volume; UF: unbound drug fraction; BBB: blood-brain barrier permeability; Y: yes; N: no

Table 04: Toxicological profile *in silico* of the 1,10 phenanthroline-5,6 dione.

Azole/ 1,10 – Phenantroline- 5,6 dione	Toxicity				
	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	Minnow toxicity	<i>T.piriform</i> toxicity	Hepatotoxicity
	Numeric (mol/kg)	Numeric (log mg/kg_bw/day)	Numeric (log LC 50)	Numeric (log ug/L)	Categorical (Yes/No)
Itra	2.966	0.055	-4.446	0.285	Yes
Phendione	2.349	0.42	1.991	0.285	No
Ag-phendio	2.476	1.088	5.016	0.285	No
Cu-phendio	2.482	0.357	13.167	0.285	No

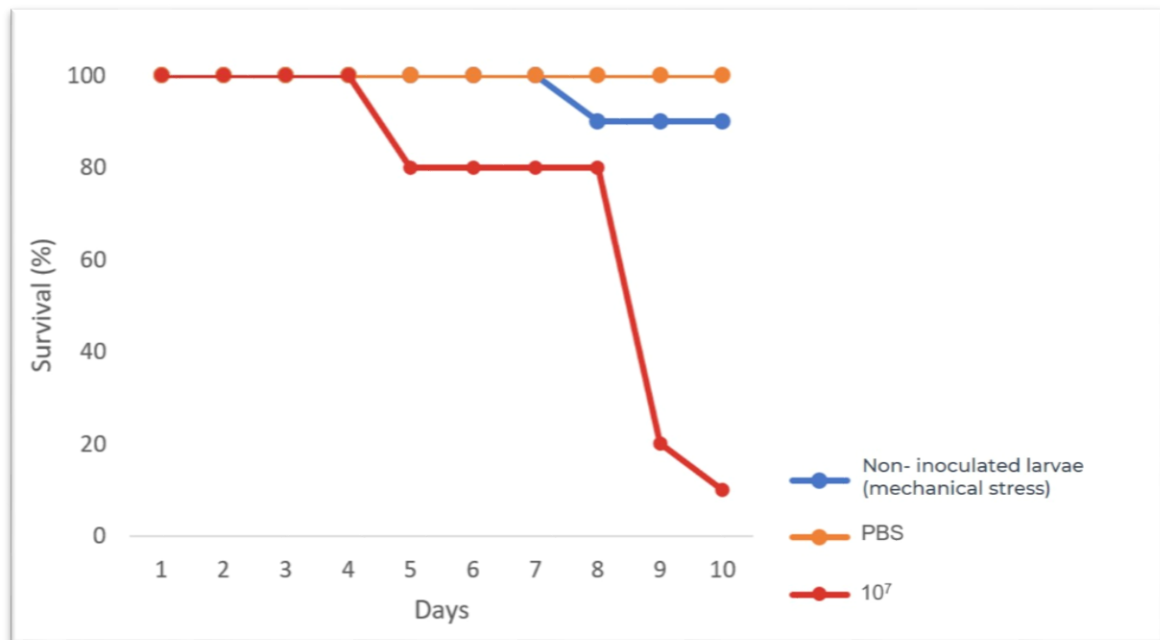
Itra: Itraconazole.

Table 05: Toxicological profile end points *in silico* of the 1,10 phenanthroline-5,6 dione.

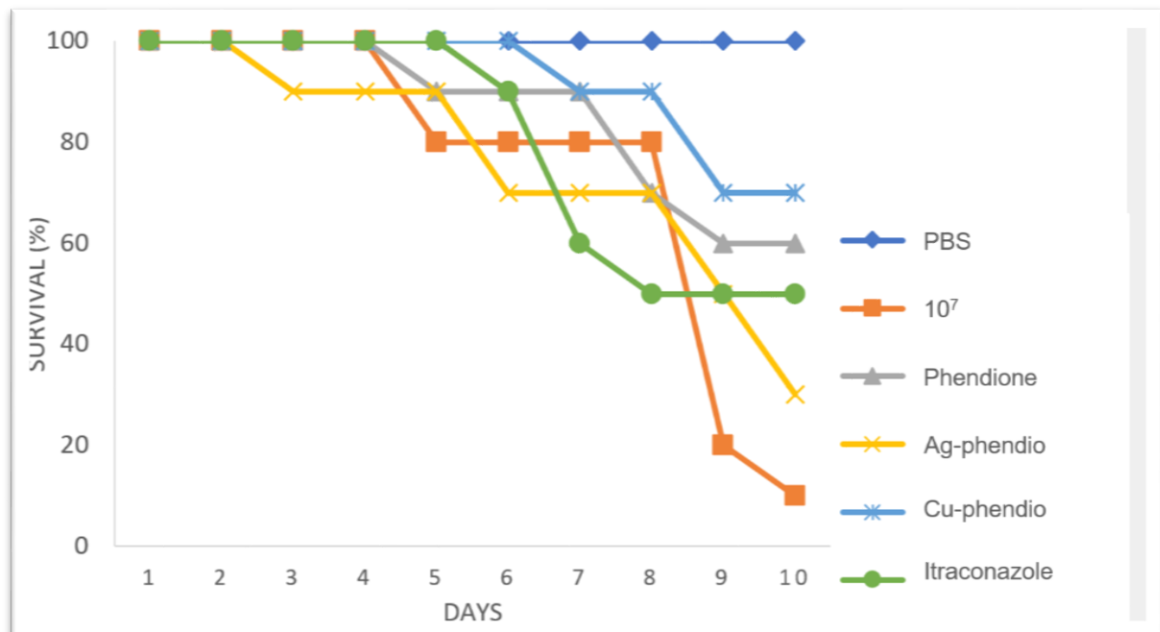
Azole/ 1,10 - Phenantroline-5,6 dione	Toxicological end points			
	Categorical (Yes/No)			
	Carcinogenicity	Cytotoxicity	Mutagenicity	Immunotoxicity
Itra	No	No	No	Yes
Phendione	Yes	No	Yes	No
Ag-phendio	No	No	No	No
Cu-phendio	No	No	No	No

Itra: Itraconazole.

Graphic 01: Percentage survival of *G. mellonella* larvae inoculated with 1×10^7 *S. brasiliensis* and controls.



Graphic 02: Percentage survival of *G. mellonella* larvae inoculated with 1×10^7 *S. brasiliensis*, 1,10-phenantroline-5,6 dione and controls.



5. DISCUSSÃO

Embora a esporotricose seja uma doença de preocupação e interesse em saúde pública e poucos antimicrobianos estejam disponíveis para seu tratamento, estudos de novas opções terapêuticas são ainda poucos, porém, vitais para o combate a essa zoonose (1,9). O presente trabalho investigou isolados clínicos de *S. brasiliensis* obtidos de lesões de gatos domésticos com esporotricose classificados clinicamente como responsivos ou irresponsivos ao tratamento com itraconazol, sendo alguns isolados vindo de gatos com episódios de recidiva. O tratamento desses felinos variou de 2 a 60 meses e, como esperado, isolados clínicos de *S. brasiliensis* apresentaram MICs compatíveis com sensibilidade reduzida ao itraconazol ou “tipo não selvagem”, quando obtidos de gatos irresponsivos ao tratamento, conforme proposto por ESPINEL-INGROFF e coautores (2017) e Almeida-Paes e coautores (2017). A idade média dos gatos foi em torno dos três anos está de acordo com relatos anteriores sobre esporotricose e também com a predominância do sexo masculino. (8,9,14).

Embora o itraconazol seja a primeira opção terapêutica para o tratamento da esporotricose humana e de felinos domésticos (9), os pontos de corte da microdiluição em caldo não foram estabelecidos. Como consequência, a definição de parâmetros qualitativos de *Sporothrix* spp. quanto a resposta (sensibilidade ou resistência) aos diferentes antifúngicos permanece um enigma a ser resolvido. Em uma tentativa de contribuir para esta definição, valores de corte epidemiológicos (ECVs) foram sugeridos (129,130), embora ainda não totalmente correlacionados com as respostas clínicas dos pacientes (131,132). Recentemente, Nakasu e coautores (2020) publicaram um único estudo descrevendo esforços sólidos para traçar um paralelo entre os dados *in vitro* e o acompanhamento terapêutico felino (133).

A literatura sugere que ECVs com CIMs na faixa de 0,5-2mg/L para o itraconazol são considerados indicativos de sensibilidade *in vitro* de *S. brasiliensis* (129,130,133,134). Os dados do presente estudo em isolados clínicos de *S. brasiliensis* corroboram essa indicação, uma vez que aqueles oriundos de felinos domésticos com resposta terapêutica efetiva ao azol apresentaram CIM *in vitro* de

2µg/mL (2mg/L). Ao contrário, *S. brasiliensis* obtido de felino doméstico apresentando resposta terapêutica não sensível ao itraconazol, com valores de CIM entre 8 e 32 µg/mL, portanto considerado “tipo não selvagem” (129,130) ou mesmo resistente (130,133,134). Da mesma forma, Nakasu e coautores (2020) em um hospital veterinário do Sul do Brasil (Pelotas, RS), mostraram que cerca de metade dos gatos investigados era irresponsíveis ao itraconazol com CIMs correspondendo à resistência do *S. brasiliensis* a esta droga. No entanto, os CIMs relatados para itraconazol detectados na presente investigação foram maiores do que aqueles relatados por esses autores. Isso pode refletir o fato de que a Região Sul do Brasil está localizada a 1800 km de distância da área hiperendêmica (Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil) com um nível mais baixo de endemicidade de esporotricose (8,14).

Vários autores sugeriram que *S. brasiliensis* apresenta sensibilidade reduzida aos azólicos (129,130,133,134), revelando a necessidade premente de alternativas terapêuticas distintas. Nos últimos anos, as quinonas tornaram-se alvo de vários estudos devido às suas diversas atividades biológicas conhecidas, tais como, antibacteriana e antifúngica (68,135). Inclusive, com propriedades antifúngicas contra *S. schenckii* (58). O presente estudo realizou uma análise de novos onze derivados de quinonas frente a isolados clínicos WT e NWT e a cepa padrão de *S. brasiliensis*. Os derivados quinônicos Q1 e Q8 exibiram valores de MIC e MFC corroborando seu potencial para o planejamento de novas moléculas antifúngicas (58,68). De fato, Tandon e coautores (2006), avaliando o potencial antibacteriano e antifúngico de derivados de quinona, mostraram CIMs entre 6,25 - ≥ 50 µg/mL para isolados distintos de *S. schenckii*. Posteriormente, os mesmos autores (58) testaram novas moléculas de naftoquinona contra *S. schenckii*, e os MICs₅₀ ficaram entre 0,78 - \rightarrow 50 µg/mL. Moléculas de diidrofuranoaftoquinonas, relatadas recentemente, foram testadas contra *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, e exibiram CIMs₅₀ variando de 4-32 µM (50). No presente estudo, os CIMs obtidos após desafio *in vitro* de *S. brasiliensis* versus quinonas, foram maiores do que aqueles relatados na literatura (50,58,68), mas ainda compatíveis com futuro potencial terapêutico dessa classe química.

Este estudo fez a prospecção de três hidrazonas e essas mostraram potencial atividade antifúngica contra diferentes isolados clínicos de *S. brasiliensis* e a cepa padrão. A exposição *in vitro* a H1 forneceu CIM de 1 µg/mL contra *S. brasiliensis* NWT1, enquanto a CIM correspondente para o itraconazol foi 32x maior. Ademais, todas as hidrazonas testadas exibiram CFM compatível a moléculas com potencial fungicida (136) pouco encontrado no mercado farmacológico. Notavelmente, este isolado infectou um gato doméstico com história de esporotricose irresponsiva e prolongada ao itraconazol, com recorrência, recentemente, da lesão na base de sua cauda, já amputada devido a essa zoonose.

De fato, o potencial terapêutico para a classe química das hidrazonas foi relatado previamente, uma vez que apresentam diversas atividades biológicas (76), incluindo antimicóticas contra fungos dimórficos como *Coccidioides posadasii*, bem como leveduras de alta relevância como *Candida* spp. e *Trichosporon asahii* em infecções adquiridas na comunidade e em hospitais (75,77,78). Cordeiro e coautores (2016) consideraram CIMs 31,2 - 250 µg/mL frente a *Coccidioides posadasii* como compatíveis com o investimento em pesquisas futuras em hidrazonas contra esse fungo dimórfico (77). Esses valores são mais elevados em relação aos nossos achados *in vitro*, evidenciando o potencial dessas moléculas. Espécies distintas de *Candida* desafiadas ao crescimento *in vitro* na presença de diferentes derivados de hidrazona forneceram CIMs variando de 0,25 a 128 µg/mL, reforçando, novamente o potencial dessa classe (78). Anteriormente, Casanova e coautores (2015) propuseram que um valor de CIM entre 8 - 32 µg/mL poderia ser considerado um resultado encorajador após o teste *in vitro* de novas hidrazonas contra *Candida parapsilosis* e *Trichosporon asahii* (75). Juntos, nossos resultados apontam para esta classe como tendo forte potencial para investimento futuro como uma nova classe para controlar infecções fúngicas.

Ao fazer uma análise da estrutura-atividade da hidrazona H1 que apresentou os melhores resultados *in vitro* frente aos isolados clínicos felinos, observamos a presença de um grupo nitro (NO₂), que possui forte efeito retirador de elétrons, ligado ao anel benzênico. Em adição, observamos a presença de dois átomos de oxigênios que são aceptores de ligação com o hidrogênio, promovendo ligações intermoleculares. Logo, o forte efeito retirador de elétrons do grupo nitro e

as possíveis interações realizadas pelos átomos de oxigênio desse grupo estão possivelmente favorecendo a boa atividade antifúngica, assim como observado na literatura (137). Por sua vez, a hidrazona H3 possui duas moléculas de cloro (Cl) ligadas ao anel benzênico nas posições: Meta (1,3) e Para (1,4). Sabe-se que a família dos halogênios é constituída por átomos retiradores de elétrons por indução, logo, conforme aumenta o número de átomo de Cl (cloro) ligados ao anel benzênico, promovendo uma maior interação hidrofóbica, gera-se também uma deficiência eletrônica neste anel, favorecendo possivelmente a atividade antifúngica dessa molécula conforme já descrito na literatura para as hidrazonas (138).

As 1,10-fenantrolina- 5,6-diona têm sido alvo de diversos estudos nas últimas décadas devido ao seu potencial quimioterápico, além de diversas outras atividades biológicas (104,108,113,139). O presente estudo avaliou *in vitro*, *in vivo* e *in silico* três quelatos de 1,10 fenantrolina com vasto potencial antimicrobiano já relatado. (102,111,112,139), mas nunca antes avaliado contra o fungo patogênico dimórfico *S. brasiliensis*. Esses compostos mostraram resultados promissores, exibindo CIMs 25X mais baixos em comparação ao itraconazol em isolados de NWT frente a forma parasitária de *S. brasiliensis*. Além disso, essas moléculas exibiram um potencial efeito fungicida, *in vitro*, de acordo com os resultados obtidos de MFC (136). Um estudo avaliou o perfil antifúngico dos mesmos quelatos de fenantrolina contra *P. verrucosa* (fungo demático) e obteve valores de CIM variando de 2,5 -> 20 mg/L (102). Outro trabalho desafiou essas moléculas contra *C. albicans*, e elas exibiram CIMs variando de 1,25 - 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (112). Recentemente, Gandra e coautores (2020) avaliaram o perfil antifúngico de algumas moléculas de fenantrolina contra isolados de *Candida haemulonii* e obtiveram IC50 variando de 0,36 - 0,77 mg/L (139), afirmando o potencial antimicrobiano dessas moléculas.

Ao avaliar a estrutura das moléculas de fenantrolina, observamos que os quelatos Ag-fendio e Cu-fendio, conforme descrito em outros trabalhos (102,112,139), apresentaram resultados *in vitro* melhores em relação aos da fendiona. Relatos da literatura mostram que íons metálicos, principalmente contendo metais de transição, apresentam potencial promissor para atividade biológica (140,141), corroborando os resultados aqui obtidos.

A semelhança entre a resposta imune dos insetos e a resposta imune inata dos mamíferos tem levado a um aumento exponencial o uso do modelo experimental *in vivo*, *G. mellonella*. Este modelo fornece o estudo das propriedades antimicrobianas de novos candidatos, avalia a interação do patógeno com a resposta imune do hospedeiro, entre outras possibilidades (142). Silva e coautores (2018), por exemplo, avaliou a eficácia de alguns antifúngicos clássicos da a partir do modelo *in vivo* *G. mellonella*, infectando essas larvas com isolados clínicos de *C. haemulonii*. Clavijo-Giraldo e coautores (2016) também usaram esse inseto para analisar a virulência de isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. Nosso estudo selecionou as moléculas com menores valores obtidos na metodologia *in vitro* afim de avaliar sua eficácia *in vivo*. Assim, os três quelatos de 1,10 fenantrolina foram submetidos a testes com as larvas, *G. mellonella* e os resultados obtidos reafirmaram o grande potencial dessas moléculas visto que elas foram capazes de aumentar a porcentagem de sobrevivência das larvas infectadas (60% e 70% para a fendiona e Cu-fendio, respectivamente), corroborando dados já citados na literatura a respeito desse grupo de moléculas (102,107,111).

Extratos brutos e óleos essenciais são alternativas consideradas de grande interesse devido às diversas atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana contra fungos de importância médica e veterinária (53), como *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (52,54). O presente estudo foi o primeiro a avaliar os potenciais propriedades antifúngicas de sete extratos brutos de três gêneros de plantas diferentes (*Ocotea*, *Myrciaria* e *Hypericum*) contra isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Os extratos de *Ocotea* forneceram CIMs e CFMs que podem ser interpretados como valores promissores e dignos de investimento em pesquisa futura. Os valores de *O. notata* foram particularmente interessantes contra a forma parasitária de *S. brasiliensis*. A mesma observação foi mostrada por Angels e coautores (2020) para *Candida krusei* (143).

Myrciaria floribunda (H. West ex Willd.) O. Berg, uma planta distribuída de Norte a Sul do Brasil, é uma espécie nativa da Mata Atlântica (127). Curiosamente, seu extrato foi ainda mais eficaz na inibição / eliminação *in vitro* de formas de levedura de isolados de NWTs de *S. brasiliensis*. Por outro lado, o perfil de *H. brasiliense* apresentou valores mais elevados, embora ainda exibindo um perfil

de sensibilidade compatível com o desenvolvimento futuro de antifúngicos. De fato, o gênero *Hypericum* composto por diversos metabólitos, como γ -pirona e xantonas, apresentou atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* (144) e *Candida albicans* (145).

Poucos relatos descreveram as propriedades antifúngicas de compostos de origem vegetal contra *Sporothrix* spp. Cleff e colaboradores (2008) consideraram resultados promissores *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) contra *S. schenckii* isolado de felinos domésticos com CIMs de 250 a 500 $\mu\text{g/mL}$ (52,53). Outro estudo *in vitro* realizado com extratos de *Origanum manjorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) contra *S. brasiliensis* originado de animais residentes na Região Sul do Brasil, revelou CIMs em torno de 40 mg/mL^{-1} (51). No presente estudo, extratos brutos *in vitro* apresentaram CIMs ainda mais baixos contra *S. brasiliensis* e, mais importante, CIMs e CFMs foram ainda mais baixos para as formas de levedura do *S. brasiliensis* resistente a itraconazol. Juntos, esses resultados encorajam novos esforços de pesquisa sobre compostos naturais como importantes alternativas para o tratamento da esporotricose felina.

No entanto, uma limitação que reconhecemos é a necessidade de fracionamento para determinar o metabólito ativo para cada extrato da espécie vegetal investigada. Uma hipótese é a atividade antifúngica relacionada a xantonas ou flavonóides como observado antes para *C. albicans* (145–148) e *Cryptococcus neoformans* (149).

Os derivados sintéticos de quinonas, hidrazonas e fenantrolinas foram submetidos à análise *in silico*. Absorção é o processo pelo qual o candidato a medicamento passa do ponto de administração (local extravascular) para o sangue (circulação sistêmica). Valores compreendidos entre 70% e 90%, apresentam um perfil intestinal ideal (150). Assim, todos os derivados testados revelaram uma boa absorção teórica no intestino, semelhante ao itraconazol. Além disso, a maioria dos derivados de quinona e fenantrolina, apresentaram permeabilidade às células Caco-2, preditiva, semelhante ao itraconazol (151). Um último parâmetro de absorção foi analisado empregando o substrato ou inibidor dos transportadores da glicoproteína-P (152). A cinética de absorção não linear dos substratos da glicoproteína P foi relatada devido à atividade de efluxo mediado pelo transportador de saturação,

promovendo a inibição da glicoproteína P intestinal resultando em efeitos significativos de interação medicamentosa (DDI) (153,154). Os resultados sugeriram que os compostos derivados Q1, Q7, H2 e H3 não eram substratos da glicoproteína P, sugerindo uma boa biodisponibilidade oral *in silico* para todos os derivados analisados a serem explorados. A fendiona (um derivado de fenantrolina), as quinonas Q1, Q7 e as hidrazonas H2; H3 não foram vistas como substrato da glicoproteína P, contudo as demais moléculas exibiram um perfil de inibição preditiva.

Parâmetros de distribuição de todas as moléculas sintéticas foram avaliados. O VDss indica o volume teórico que uma dose total precisaria para ser distribuída uniformemente no plasma na mesma concentração observada no plasma sanguíneo. Todos os compostos mostraram valores mais baixos de VDss, exceto o Cu-fendio e a fendiona. Logo para a maioria dos derivados parece que são necessárias doses plasmáticas mais baixas para o perfil de distribuição. As hidrazonas e as fenantrolinas apresentaram uma fração do fármaco não ligada, maior em relação ao itraconazol, importante resultado pois a forma não ligada da droga costuma ser a responsável pelo exercício da atividade farmacológica (152). A barreira hematoencefálica (BBB) foi analisada e nenhum composto (exceto o H3) foi capaz de atravessar preditivamente. Resultado importante, pois, acarreta uma menor possibilidade de danos tóxicos ao cérebro e à corrente sanguínea, uma vez que os quelatos de 1,10 fenantrolina forem metabolizados (151).

As CYP representam as enzimas de metabolização de fármacos de fase I mais estudadas e também estão implicadas nas interações fármaco-fármaco (DDIs) mediadas pela inibição de fármacos (155). Apesar de nenhum dos derivados ter sido substrato para a isoenzima 2D6 do Citocromo P450 testada. Todas as quinonas são substrato de 3A4, provavelmente como o itraconazol. Além disso, dentre os derivados testados, o H3, o Ag-fendio e a fendiona atuaram como inibidores da CYP1A2. Curiosamente, CYP1A2 é uma das principais enzimas de metabolização de xenobióticos em humanos, e um estudo recente associou essa enzima à bioativação de procarcinogênese, incluindo 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona (NNK), um carcinógeno pulmonar potente e coespecífico do tabaco. (154,155).

A depuração é uma constante que descreve a relação entre a concentração da droga no corpo. Importante para determinar a eliminação da droga (156). Todas as hidrazonas, a fendiona e o quelato de prata (Ag-fendio) exibiram resultados metabólicos de uma possível excreção renal, enquanto que as quinonas e o quelato de cobre (Cu-fendio) indicaram uma possível metabolização hepática, tal como o itraconazol.

A toxicidade tem sido uma preocupação significativa para a segurança dos candidatos a medicamentos. A hepatotoxicidade ainda é um dos maiores problemas de toxicidade de drogas (157). Consequentemente, apenas os derivados Q6, Q7, H1, H3 e os quelatos de 1,10 fenantrolina não mostraram hepatotoxicidade prevista.

Em relação ao teste de toxicidade *in silico* de peixinhos, um valor de concentração letal equivalente (LC50), representando a concentração de uma molécula necessária para causar a morte de 50% dos peixinhos Fathead testados experimentalmente, LC50 <0,5 mM (ou seja, log LC50 <- 0,3) são considerados causadores de toxicidade aguda. Os quelatos de 1,10 fenantrolina, a maioria das hidrazonas e as quinonas, Q6 e Q7 não pareceram apresentar toxicidade aguda no teste do peixinho. A maioria das quinonas, exceto Q8, hidrazonas e as fenantrolinas mostraram se menos tóxicas em comparação ao itraconazol a partir da análise prevista do log LOAEL (158). Nossas moléculas sugerem que uma dose mais longa de cada molécula deve ser usada para induzir efeitos adversos e isso é esperançoso e indica uma grande margem de segurança esperada para esses protótipos. Nenhuma hidrazona foi potencialmente inibidora dos canais HERG I e II (159), enquanto as quinonas não pareceram inibir o HERG I. Evitando problemas fatais de batimento cardíaco e síndrome do QT curto.

Por fim, parâmetros toxicológicos preditivos foram avaliados (160,161) e nenhuma molécula apresentou uma possível citotoxicidade ou imunocitotoxicidade. Hidrazonas, quinonas e a maioria das fenantrolinas não apresentaram um possível efeito mutagênico e carcinogênico. Em geral, estudos teóricos de toxicidade mostraram que os derivados eram menos tóxicos do que o antifúngico de escolha.

6. CONCLUSÃO

A partir da avaliação *in vitro*, *in vivo* e *in silico*, das propriedades antifúngicas das diferentes classes químicas e dos extratos naturais frente aos isolados clínicos do *Sporothrix brasiliensis* oriundos de felinos domésticos da região hiperendêmica do Rio de Janeiro, foi possível concluir:

- O perfil *in vitro* dos isolados clínicos WT (sensível) e NWT (resistente) frente ao itraconazol está compatível com os dados clínicos dos felinos domésticos;
- Derivados sintéticos inéditos de hidrazona H1 e H3, e todos os quelatos de 1,10 fenantrolina exibem CIMs promissoras, inferiores às obtidas para o itraconazol, frente aos isolados WT e NWT de *S. brasiliensis*;
- Extratos naturais da *Ocotea pulchella* e da *Myrciaria floribunda* apresentam potencial antifúngico promissor de acordo com CIMs obtidas principalmente para as leveduras dos isolados NWT de *S. brasiliensis*;
- Todas as hidrazonas, quelatos de 1,10 fenantrolina e extratos brutos apresentam perfil fungicida de acordo com as CFMs obtidas
- Os quelatos de 1,10 fenantrolina, principalmente o Cu-phendio, aumentam a sobrevivência da *G. mellonella* infectada pelo *S. brasiliensis*;
- Os derivados sintéticos de hidrazona, fenantrolina e quinona apresentam, *in silico*, baixo risco teórico de toxicidade e bom perfil preditivo farmacológico, com parâmetros similares ou melhores em relação ao controle experimental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species [Internet]. Mycopathologia. Springer; 2020 [cited 2020 Aug 14]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32052359/>
2. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. Vol. 12, PLoS Pathogens. Public Library of Science; 2016.
3. Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Vega G, Rodrigues AM, de Camargo ZP, et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. Med Mycol. 2018 Apr 1
4. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. An Bras Dermatol. 2017;92(5):606–20.
5. Lutz A, Splendore A. Sobre uma Micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. 1907;10(21):443–50.
6. Rippon JW. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia; 1988
7. Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião IDF, Wanke B, Schubach A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. Rev Panam Salud Publica. 2010 Jun
8. Gremião, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. Sheppard DC, editor. PLOS Pathog. 2017 Jan 19;13(1):e1006077.
9. Gremião IDF, E M da S da R, H M, AJB C, MO X, MR de F, et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. Braz J Microbiol. 2021 Mar 1
10. Lacaz C da S, Porto E, Heins-Vaccari E, Melo NT de. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier, editor. São Paulo: Sarvier; 1998. 326–331 p.
11. de Beer ZW, Duong TA, Wingfield MJ. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. Stud Mycol. 2016 Mar
12. Barros MBL, Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Clin Microbiol Rev. 2011 Oct 1

13. Macêdo-Sales PA, Souza LOP, Della-Terra PP, Lozoya-Pérez NE, Machado RLD, Rocha EM da S da, et al. Coinfection of domestic felines by distinct *Sporothrix brasiliensis* in the Brazilian sporotrichosis hyperendemic area. *Fungal Genet Biol.* 2020 Jul 20.
14. Macêdo-Sales PA, Souto SRLS, Destefani CA, Lucena RP, Machado RLD, Pinto MR, et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. *BMC Vet Res.* 2018 Dec 18.
15. Gremião IDF, Oliveira MME, Monteiro de Miranda LH, Saraiva Freitas DF, Pereira SA. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2020 Mar.
16. Falcão EMM, de Lima Filho JB, Campos DP, Valle ACF do, Bastos FI, Gutierrez-Galhardo MC, et al. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). *Cad Saude Publica.* 2019 May 2;35(4):e00109218.
17. Michelon L, Piñeiro MBC, Madrid IM, Osório L da G, Bruhn FRP, Soares GF, et al. Dados epidemiológicos da esporotricose felina na região Sul Do Rio Grande do Sul: uma abordagem em saúde pública Epidemiological data on feline sporotrichosis in Southern Rio Grande Do Sul: a public health approach. *Brazilian J Heal Rev.* 2019 Nov 14
18. Almeida P, Giordano C. Boletim Epidemiológico Esporotricose 001/2018. *Boletim Epidemiológico Esporotricose 001/2018.* Rio de Janeiro; 2018.
19. Giordano C, Almeida P, Santana A, Inês M. Boletim Epidemiológico Esporotricose N° 001/2019. Rio de Janeiro; 2019.
20. Giordano C. Boletim Epidemiológico Esporotricose N° 001-2021. Rio de Janeiro; 2021.
21. Rosa CS da. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS Faculdade de Veterinária Programa de Pós-Graduação em Veterinária Tese Esporotricose felina e canina em área endêmica: epidemiologia e tratamento. Universidade Federal de Pelotas; 2017.
22. Costa C. SES realiza Simpósio para discutir situação da esporotricose na Paraíba. Governo do Estado da Paraíba. 2019.
23. Silva GM, Howes JCF, Leal CAS, Mesquita EP, Pedrosa CM, Oliveira AAF, et al. Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesqui Veterinária Bras.* 2018.
24. Gremiao IDF, Menezes RC, Schubach TMP, Figueiredo ABF, Cavalcanti MCH, Pereira SA. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol.* 2015 Jan 1 [cited 2020 Jun 6];53(1):15–21.

25. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015 Jan 1 [cited 2020 May 22];53(1):3–14.
26. Rojas OC, Bonifaz A, Campos C, Treviño-Rangel R de J, González-álvarez R, González GM. Molecular identification, antifungal susceptibility, and geographic origin of clinical strains of *Sporothrix schenckii* complex in Mexico. *J Fungi*. 2018 Sep 1;4(3).
27. Córdoba S, Isla G, Szusz W, Vivot W, Hevia A, Davel G, et al. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. *Mycoses*. 2018 Jul 1
28. Etchecopaz AN, Lanza N, Toscanini MA, Devoto TB, Pola SJ, Daneri GL, et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. *J Mycol Med*. 2020 Apr 1.
29. Etchecopaz AN, Scarpa M, Mas J, Cuestas ML. *Sporothrix brasiliensis*: A growing hazard in the Northern area of Buenos Aires Province? *Rev Argent Microbiol*. 2020 Mar.
30. Rios ME, Suarez J, Moreno J, Vallee J, Moreno JP. Zoonotic Sporotrichosis Related to Cat Contact: First Case Report from Panama in Central America. *Cureus*. 2018 Jul 1;10(7).
31. Moussa TAA, Kadasa NMS, Al Zahrani HS, Ahmed SA, Feng P, Gerrits van den Ende AHG, et al. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. *J Med Microbiol*. 2017 May 1 [cited 2020 Apr 18];66(5):560–9.
32. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: Current status of a complex disease. Vol. 3, *Journal of Fungi*. MDPI AG; 2017.
33. De Lima Barros MB, Alves Costa DLME, Schubach TMP, Francesconi Valle AC, Lorenzi NP, Teixeira JL, et al. Endemic of zoonotic sporotrichosis: profile of cases in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008.
34. Pires C. Revisão de literatura: esporotricose felina. *Rev Educ Contin em Med Veterinária e Zootec do CRMV-SP*. 2017;15(1):16–23.
35. Miranda LHM, Conceição-Silva F, Quintella LP, Kuraiem BP, Pereira SA, Schubach TMP. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;36(4):425–32.
36. Miranda LHM, Santiago MA, Schubach TMP, Morgado FN, Pereira SA, de Oliveira R de VC, et al. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8^{low} cells and a decrease in CD4⁺ cells. *Med*

- Mycol. 2016 Jan 1 [cited 2021 Nov 21];54(1):29–39.
37. Pacheco Schubach TM, De Oliveira Schubach A, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Santos Reis R, Fialho Monteiro PC, et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec.* 2003 Feb 8.
 38. Lloret A, Hartmann K, Pennisi MG, Ferrer L, Addie D, Belák S, et al. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2013 Jul.
 39. Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo WCMA, de Oliveira HC, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol.* 2017 Jan.
 40. Lewis JS, Graybill JR. Fungicidal versus fungistatic: What's in a word? Vol. 9, *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* Expert Opin Pharmacother; 2008. p. 927–35.
 41. Garcia-Rubio R, Monteiro MC, Mellado E. Azole Antifungal Drugs: Mode of Action and Resistance. In: *Reference Module in Life Sciences* [Internet]. Elsevier; 2020. p. 1–10.
 42. Pereira SA, Schubach TMP, Gremião IDF, Silva DT da, Figueiredo FB, Assis NV de, et al. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Sci Vet.* 2018 Mar 30.
 43. Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, Rodrigues AM, Chaves AR, Barros MBL. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *J Feline Med Surg.* 2009 Aug.
 44. Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, Rodrigues AM, Honse CO, Barros MBL. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J.* 2011.
 45. Orofino Costa R, de Macedo PM, Carvalhal A, Bernardes-Engemann AR. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. *An Bras Dermatol.* 2013 May.
 46. Carnero LCG, Pérez NEL, Hernández SEG, Álvarez JAM. Immunity and treatment of sporotrichosis. Vol. 4, *Journal of Fungi.* MDPI AG; 2018.
 47. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012 Jan;125.
 48. Brilhante, Silva NF, Marques FJ d. F, Castelo-Branco D. SCM, Lima RAC d., Malaquias ADM, et al. *In vitro* inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol.* 2015 Feb 1.
 49. Forezi LSM, Borba-Santos LP, Cardoso MFC, Ferreira VF, Rozental S, Da

- Silva FDC. Synthesis And Antifungal Activity of Coumarins Derivatives against *Sporothrix* spp. *Curr Top Med Chem*. 2018 Feb 23;18(2).
50. Garcia PF, Pereira LB-S, Noronha LL, Deckman CN, Sá MHQ, Carvalho F da S, et al. Synthesis, Stability Studies, and Antifungal Evaluation of Substituted α - and β -2,3-Dihydrofuranaphthoquinones against *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii*. *Molecules*. 2019 Mar 7.
 51. Waller SB, Madrid IM, Hoffmann JF, Picoli T, Cleff MB, Chaves FC, et al. Chemical composition and cytotoxicity of extracts of marjoram and rosemary and their activity against *Sporothrix brasiliensis*. *J Med Microbiol*. 2017 Jul 1;66(7):1076–83.
 52. Cleff MB, Meinerz ARM, Schuch LFD, Rodrigues MRA, Meireles MCA, Mello JRB. Atividade in vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix schenckii*. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2008;60(2):513–6.
 53. Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, et al. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2010;62(5):1291–4.
 54. Waller SB, Madrid IM, Silva AL, Dias de Castro LL, Cleff MB, Ferraz V, et al. *In vitro* Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to Essential Oils of Lamiaceae Family. *Mycopathologia*. 2016;181(11–12):857–63.
 55. Rezende LCD De, Fumagalli F, Bortolin MS, Oliveira MG De, Paula MH De, Andrade-Neto VF De, et al. *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2013 Aug 15;23(16):4583–6.
 56. Sharma A, Santos IO, Gaur P, Ferreira VF, Garcia CRS, Da Rocha DR. Addition of thiols to o-quinone methide: New 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur J Med Chem*. 2013 Jan;59:48–53.
 57. Tandon VK, Yadav DB, Maurya HK, Chaturvedi AK, Shukla PK. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,2,3-trisubstituted-1,4-dihydrobenzo[g]quinoxaline-5,10-diones and related compounds as antifungal and antibacterial agents. *Bioorganic Med Chem*. 2006 Sep 1;14(17):6120–6.
 58. Tandon VK, Maurya HK, Mishra NN, Shukla PK. Micelles catalyzed chemoselective synthesis “in water” and biological evaluation of oxygen containing hetero-1,4-naphthoquinones as potential antifungal agents. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2011 Nov 1;21(21):6398–403.
 59. Subedi YP, Alfindee MN, Shrestha JP, Becker G, Grilley M, Takemoto JY, et al. Synthesis and biological activity investigation of azole and quinone hybridized phosphonates. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2018 Oct 1;28(18):3034–7.

60. Bolton JL, Dunlap T. Formation and biological targets of quinones: Cytotoxic versus cytoprotective effects. Vol. 30, Chemical Research in Toxicology. American Chemical Society; 2017. p. 13–37.
61. Xue W, Li X, Ma G, Zhang H, Chen Y, Kirchmair J, et al. N-thiadiazole-4-hydroxy-2-quinolone-3-carboxamides bearing heteroaromatic rings as novel antibacterial agents: Design, synthesis, biological evaluation and target identification. Eur J Med Chem. 2020 Feb 15;188:112022.
62. Suthar SK, Jaiswal V, Lohan S, Bansal S, Chaudhary A, Tiwari A, et al. Novel quinolone substituted thiazolidin-4-ones as anti-inflammatory, anticancer agents: Design, synthesis and biological screening. Eur J Med Chem. 2013 May 1;63:589–602.
63. Ebada SS, Ebrahim W. A new antibacterial quinolone derivative from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* strain Eich.5.2.2. South African J Bot. 2020 Jan 9;
64. Zhang J, Wang S, Ba Y, Xu Z. 1,2,4-Triazole-quinoline/quinolone hybrids as potential anti-bacterial agents. Vol. 174, European Journal of Medicinal Chemistry. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 1–8.
65. Kim YS, Kim KM, Song R, Jun MJ, Sohn YS. Synthesis, characterization and antitumor activity of quinolone-platinum(II) conjugates. J Inorg Biochem. 2001 Dec 1;87(3):157–63.
66. Aly AA, Mohamed AH, Ramadan M. Synthesis and colon anticancer activity of some novel thiazole/-2-quinolone derivatives. J Mol Struct. 2020 May 5;1207:127798.
67. Novais JS, Rosandiski AC, de Carvalho CM, Silva LS, Souza LCS V., Santana M V., et al. Efficient Synthesis and Antibacterial Profile of Bis(2-hydroxynaphthalene- 1,4-dione). Curr Top Med Chem. 2020 Feb 19;20(2):121–31.
68. Louvis ADR, Silva NAA, Semaan FS, Da Silva FDC, Saramago G, De Souza LCSV, et al. Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones-green palladium-catalysed Suzuki cross coupling. New J Chem. 2016 Aug 30;40(9):7643–56.
69. Gemili M, Nural Y, Keleş E, Aydın B, Seferoğlu N, Ülger M, et al. Novel highly functionalized 1,4-naphthoquinone 2-iminothiazole hybrids: Synthesis, photophysical properties, crystal structure, DFT studies, and anti(myco)bacterial/antifungal activity. J Mol Struct. 2019 Nov 15;1196:536–46.
70. Ju Woo H, Jun DY, Lee JY, Park HS, Woo MH, Park SJ, et al. Anti-inflammatory action of 2-carbomethoxy-2,3-epoxy-3-prenyl-1,4-naphthoquinone (CMEP-NQ) suppresses both the MyD88-dependent and TRIF-dependent pathways of TLR4 signaling in LPS-stimulated RAW264.7

- cells. *J Ethnopharmacol*. 2017 Jun 9;205:103–15.
71. Zhao LM, Xie TP, He YQ, Xu DF, Li SS. Synthesis and antitumor activity of 6- and 2-(1-acylsulfanylalkyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones. *Chinese Chem Lett*. 2008 Oct 1;19(10):1206–8.
 72. Goulart MOF, Zani CL, Tonholo J, Freitas LR, De Abreu FC, Oliveira AB, et al. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorganic Med Chem Lett*. 1997 Aug 5;7(15):2043–8.
 73. de Araújo M V., David CC, Neto JC, de Oliveira LAPL, da Silva KCJ, dos Santos JM, et al. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Exp Parasitol*. 2017 May 1;176:46–51.
 74. Schepetkin IA, Karpenko AS, Khlebnikov AI, Shibinska MO, Levandovskiy IA, Kirpotina LN, et al. Synthesis, anticancer activity, and molecular modeling of 1,4-naphthoquinones that inhibit MKK7 and Cdc25. *Eur J Med Chem*. 2019 Dec 1;183:111719.
 75. Casanova BB, Muniz MN, De Oliveira T, De Oliveira LF, Machado MM, Fuentefria AM, et al. Synthesis and biological evaluation of Hydrazone derivatives as antifungal agents. *Molecules*. 2015;20(5):9229–41.
 76. Chandra S, Vandana, Kumar S. Synthesis, spectroscopic, anticancer, antibacterial and antifungal studies of Ni(II) and Cu(II) complexes with hydrazine carboxamide, 2-[3-methyl-2-thienyl methylene]. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2015 Jan 25;135:356–63.
 77. Cordeiro R de A, de Melo CVS, Marques FJ de F, Serpa R, Evangelista AJ de J, Caetano EP, et al. Synthesis and *in vitro* antifungal activity of isoniazid-derived hydrazones against *Coccidioides posadasii*. *Microb Pathog*. 2016 Sep;98:1–5.
 78. Secci D, Bizzarri B, Bolasco A, Carradori S, D'Ascenzio M, Rivanera D, et al. Synthesis, anti-*Candida* activity, and cytotoxicity of new (4-(4-iodophenyl)thiazol-2-yl)hydrazine derivatives. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2012;53:246–53.
 79. Ünver H, Berber B, Demirel R, Koparal AT. Design, Synthesis, Anti-Proliferative, Anti-microbial, Anti-Angiogenic Activity and In Silico Analysis of Novel Hydrazone Derivatives. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019 Mar 19;19(13):1658–69.
 80. Qin J, Liu J, Wu C, Xu J, Tang B, Guo K, et al. Synthesis and biological evaluation of (3/4-(pyrimidin-2-ylamino)benzoyl)-based hydrazine-1-carboxamide/carbothioamide derivatives as novel RXR α antagonists. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020 Jan 1;35(1):880–96.
 81. Arif R, Nayab PS, Ansari IA, Shahid M, Irfan M, Alam S, et al. Synthesis,

- molecular docking and DNA binding studies of phthalimide-based copper(II) complex: *In vitro* antibacterial, hemolytic and antioxidant assessment. *J Mol Struct.* 2018 May 15;1160:142–53.
82. Batista CRA, Godin AM, Melo ISF, Coura GME, Matsui TC, Dutra MMGB, et al. The phthalimide analogues N-3-hydroxypropylphthalimide and N-carboxymethyl-3-nitrophthalimide exhibit activity in experimental models of inflammatory and neuropathic pain. *Pharmacol Reports.* 2019 Dec 1;71(6):1177–83.
 83. Philoppes JN, Lamie PF. Design and synthesis of new benzoxazole/benzothiazole-phthalimide hybrids as antitumor-apoptotic agents. *Bioorg Chem.* 2019 Aug 1;89:102978.
 84. Pan L, Li X, Gong C, Jin H, Qin B. Synthesis of N-substituted phthalimides and their antifungal activity against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Microb Pathog.* 2016 Jun 1;95:186–92.
 85. Shankar RA, Hideg K, Zweier JL, Kuppusamy P. Targeted antioxidant properties of N-[(tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamido)propyl]phthalimide (TPC-NH) in preventing postischemic myocardial injury. *Free Radic Biol Med.* 1998 Jan 1;25:S39.
 86. R K, Bodke YD. Synthesis, Analgesic and Anti-inflammatory activity of Benzofuran pyrazole Heterocycles. *Chem Data Collect.* 2020 Jun 10;100453.
 87. Abdellatif KRA, Abdelall EKA, Lamie PF, Labib MB, El-Nahaas ES, Abdelhakeem MM. New pyrazole derivatives possessing amino/methanesulphonyl pharmacophore with good gastric safety profile: Design, synthesis, cyclooxygenase inhibition, anti-inflammatory activity and histopathological studies. *Bioorg Chem.* 2020 Jan 1;95:103540.
 88. Liu H, Chu ZW, Xia DG, Cao HQ, Lv XH. Discovery of novel multi-substituted benzo-indole pyrazole schiff base derivatives with antibacterial activity targeting DNA gyrase. *Bioorg Chem.* 2020 Jun 1;99:103807.
 89. Soltani B, Ghorbanpour M, Ziegler CJ, Ebadi-Nahari M, Mohammad-Rezaei R. Nickel (II) and cobalt (II) complexes with bidentate nitrogen-sulfur donor pyrazole derivative ligands: Syntheses, characterization, X-ray structure, electrochemical studies, and antibacterial activity. *Polyhedron.* 2020 Apr 1;180:114423.
 90. Zhang A, Zhou J, Tao K, Hou T, Jin H. Design, synthesis and antifungal evaluation of novel pyrazole carboxamides with diarylamines scaffold as potent succinate dehydrogenase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018 Oct 1 [cited 2020 Jun 10];28(18):3042–5.
 91. Zhang J, Tan D-J, Wang T, Jing S-S, Kang Y, Zhang Z-T. Synthesis, crystal structure, characterization and antifungal activity of 3,4-diaryl-1H-Pyrazoles

- derivatives. *J Mol Struct.* 2017 Dec 5;1149:235–42.
92. Titi A, Messali M, Alqurashy BA, Touzani R, Shiga T, Oshio H, et al. Synthesis, characterization, X-Ray crystal study and bioactivities of pyrazole derivatives: Identification of antitumor, antifungal and antibacterial pharmacophore sites. *J Mol Struct.* 2020 Apr 5;1205:127625.
 93. Verma G, Khan MF, Mohan Nainwal L, Ishaq M, Akhter M, Bakht A, et al. Targeting malaria and leishmaniasis: Synthesis and pharmacological evaluation of novel pyrazole-1,3,4-oxadiazole hybrids. Part II. *Bioorg Chem.* 2019 Aug 1;89:102986.
 94. Verma G, Chashoo G, Ali A, Khan MF, Akhtar W, Ali I, et al. Synthesis of pyrazole acrylic acid based oxadiazole and amide derivatives as antimalarial and anticancer agents. *Bioorg Chem.* 2018 Apr 1;77:106–24.
 95. Orabi EA, Orabi MAA, Mahross MH, Abdel-Hakim M. Computational investigation of the structure and antioxidant activity of some pyrazole and pyrazolone derivatives. *J Saudi Chem Soc.* 2018 Sep 1;22(6):705–14.
 96. Poormohammadi EB, Behzad M, Abbasi Z, Astaneh SDA. Copper complexes of pyrazolone-based Schiff base ligands: Synthesis, crystal structures and antibacterial properties. *J Mol Struct.* 2020 Apr 5;1205:127603.
 97. Ramadan AM, Alshehri AA, Bondock S. Synthesis, physico-chemical studies and biological evaluation of new metal complexes with some pyrazolone derivatives. *J Saudi Chem Soc.* 2019 Dec 1;23(8):1192–205.
 98. Shaikh I, Jadeja RN, Patel R. Three mixed ligand mononuclear Zn(II) complexes of 4-acyl pyrazolones: Synthesis, characterization, crystal study and anti-malarial activity. *Polyhedron.* 2020 Jun 1;183:114528.
 99. Mariappan G, Saha BP, Sutharson L, Singh A, Garg S, Pandey L, et al. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and toxicological evaluation of some newer 3-methyl pyrazolone derivatives. *Saudi Pharm J.* 2011 Apr 1;19(2):115–22.
 100. Abdelgawad MA, Labib MB, Ali WAM, Kamel G, Azouz AA, EL-Nahass ES. Design, synthesis, analgesic, anti-inflammatory activity of novel pyrazolones possessing aminosulfonyl pharmacophore as inhibitors of COX-2/5-LOX enzymes: Histopathological and docking studies. *Bioorg Chem.* 2018 Aug 1;78:103–14.
 101. Rigo G, Vargas B, Petro-Silveira B, Devereux M, McCann M, Souza dos Santos AL, Tasca T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology.* 2019 Aug 12;146(9):1179–83.
 102. Granato MQ, Gonçalves D de S, Seabra SH, McCann M, Devereux M, dos Santos ALS, et al. 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based compounds are

- effective in disturbing crucial physiological events of *Phialophora verrucosa*. *Front Microbiol.* 2017;8(JAN).
103. Mutlu HG. New heteroleptic Cu(II) complexes of chrysin with 2,2'-bipyridine and substituted 1,10-phenanthrolines: Synthesis, characterization, thermal stability and antioxidant activity. *J Mol Struct.* 2020 Jun 5;1209:127917.
 104. Obalı AY, Akçaalan S, Arslan E, Obalı İ. Antibacterial activities and DNA-cleavage properties of novel fluorescent imidazo-phenanthroline derivatives. *Bioorg Chem.* 2020 Jul 1, 100:103885.
 105. Đurić S, Mojicevic M, Vojnovic S, Wadepohl H, Andrejević TP, Stevanović NL, et al. Silver(I) complexes with 1,10-phenanthroline-based ligands: The influence of epoxide function on the complex structure and biological activity. *Inorganica Chim Acta.* 2020 Mar 1;502:119357.
 106. Madanhire T, Davids H, Pereira MC, Hosten EC, Abrahams A. Mixed-ligand complexes of lanthanides derived from an α -hydroxycarboxylic acid (benzilic acid) and 1,10-phenanthroline: Physicochemical properties and anticancer activity. *Polyhedron.* 2020 Jul 15;185:114583.
 107. Gandra RM, McCarron P, Viganor L, Fernandes MF, Kavanagh K, McCann M, et al. In vivo Activity of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against *Candida haemulonii* Using the *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol.* 2020;11(March):1–15.
 108. Papadia P, Margiotta N, Bergamo A, Sava G, Natile G. Platinum(II) Complexes with Antitumoral/Antiviral Aromatic Heterocycles: Effect of Glutathione upon *in vitro* Cell Growth Inhibition. *J Med Chem.* 2005 May 5; 48(9):3364–71.
 109. Ranford JD, Sadler PJ, Tocher DA. Cytotoxicity and antiviral activity of transition-metal salicylato complexes and crystal structure of Bis(diisopropylsalicylato)(1,10-phenanthroline)copper(II). *J Chem Soc Dalt Trans.* 1993 Jan 1;(22):3393–9.
 110. Roy S, Hagen KD, Maheswari PU, Lutz M, Spek AL, Reedijk J, et al. Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. *ChemMedChem.* 2008 Sep 15; 3(9):1427–34.
 111. Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the *in vivo* anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. *BioMetals.* 2009 Jun; 22(3):461–7.
 112. McCann M, Geraghty M, Devereux M, O'Shea D, Mason J, O'Sullivan L. Insights Into the Mode of Action of the Anti-*Candida* Activity of 1,10-Phenanthroline and its Metal Chelates. *Met Based Drugs.* 2000;7(4):185–93.
 113. Heffeter P, Jakupec MA, Körner W, Chiba P, Pirker C, Dornetshuber R, et al. Multidrug-resistant cancer cells are preferential targets of the new

- antineoplastic lanthanum compound KP772 (FFC24). *Biochem Pharmacol.* 2007 Jun 15; 73(12):1873–86.
114. Deegan C, McCann M, Devereux M, Coyle B, Egan DA. In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), [Ag₂(phen)₃(mal)] · 2H₂O, [Cu(phen)₂(mal)] · 2H₂O and [Mn(phen)₂(mal)] · 2H₂O (malH₂ = malonic acid) using human cancer cells. *Cancer Lett.* 2007 Mar 18; 247(2):224–33.
115. Pereira RV, Mecnas AS, Malafaia CRA, Amaral ACF, Muzitano MF, Simas NK, et al. Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of extracts and fractions of *Ocotea notata* (Ness) Mez (Lauraceae). *Nat Prod Res* [Internet]. 2019 Apr 16 [cited 2020 Apr 21];1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30990334>
116. Garrett R, Romanos MT V., Borges RM, Santos MG, Rocha L, da Silva AJR. Antitherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. *Brazilian J Pharmacogn.* 2012 Mar;22(2):306–13.
117. Costa IFB, Calixto SD, Heggdorne de Araujo M, Konno TUP, Tinoco LW, Guimarães DO, et al. Antimycobacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Ocotea notata* from Brazilian Restinga. *Sci World J.* 2015; 2015:1–9.
118. Candido LP, Varela RM, Torres A, Molinillo JMG, Gualtieri SCJ, Macías FA. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. *Chem Biodivers.* 2016 Aug 1; 13(8):1058–67.
119. Pires LA, Cardoso VJM, Rodrigues RR, Joly CA. Sobrevivência e crescimento inicial de *Ocotea pulchella* (Lauraceae) em uma floresta de restinga da Ilha do Cardoso, SP. *Rodriguésia.* 2012 Dec; 63(4):763–74.
120. Padilla AM, Isabela CS, Veronica MHH, Maria JBF, Clarice WA, Juliana RB, et al. *In vitro* antiviral activity of Brazilian Cerrado plant extracts against animal and human herpesviruses. *J Med Plants Res.* 2018 Mar 24; 12(10):106–15.
121. Assafim M, de Coriolano EC, Benedito SE, Fernandes CP, Lobo JFR, Sanchez EF, et al. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. *J Venom Res.* 2011; 2:11–6.
122. Slusarski SR, Cervi AC, Guimarães OA. Estudo taxonômico das espécies nativas de *Hypericum* L. (*Hypericaceae*) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Bot Brasilica.* 2007 Jan;21(1):163–84.

123. Rocha L, Marston A, Auxiliadora M, Kaplan C, Stoeckli-Evans H, Thull U, et al. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. 1994 Aug; 36(6):1381–5.
124. Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MAC, Stoeckli-Evans H, Hostettmann K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. 1995 Nov; 40(5):1447–52.
125. Perazzo FF, Lima LM, Padilha MDM, Rocha LM, Sousa PJC, Carvalho JCT. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008 Jul;18(3):320–5.
126. Tietbohl LAC, Oliveira AP, Esteves RS, Albuquerque RDDG, Folly D, Machado FP, et al. Antiproliferative activity in tumor cell lines, antioxidant capacity and total phenolic, flavonoid and tannin contents of *Myrciaria floribunda*. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(2):1111–20.
127. Tietbohl LAC, Barbosa T, Fernandes CP, Santos MG, Machado FP, Santos KT, et al. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *dysdercus peruvianus* and *oncopeltus fasciatus*. *Brazilian J Pharmacogn*. 2014;24(3):316–21.
128. Feder D, Gonzalez MS, Mello CB, Santos MG, Rocha L, Kelecom A, et al. Exploring the insecticide and acaricide potential of development regulators obtained from restinga vegetation from Brazil. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(1).
129. Espinel-Ingroff A, Abreu DPB, Almeida-Paes R, Brilhante RSN, Chakrabarti A, Chowdhary A, et al. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* species Identified by Molecular Methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Oct 24 [cited 2020 May 11];61(10).
130. Almeida-Paes R, Brito-Santos F, Figueiredo-Carvalho MHG, Machado ACS, Oliveira MME, Pereira SA, et al. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(5).
131. Brilhante RSN, Rodrigues AM, Sidrim JJC, Rocha MFG, Pereira SA, Gremião IDF, et al. *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil: Table 1. *Med Mycol*. 2016 Mar 1;54(3):275–9.
132. Waller SB, Dalla Lana DF, Quatrin PM, Ferreira MRA, Fuentefria AM, Mezzari A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian J Microbiol*. 2020;(May).
133. Nakasu CCT, Waller SB, Ripoll MK, Ferreira MRA, Conceição FR, Gomes A dos R, et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Brazilian J Microbiol*. 2020;

134. Waller SB, Ripoll MK, Madrid IM, Acunha T, Cleff MB, Chaves FC, et al. Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded itraconazole formulations. 2020;
135. Riffel A, Medina LF, Stefani V, Santos RC, Bizani D, Brandelli A. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. Brazilian J Med Biol Res. 2002;35(7):811–8.
136. Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):268.
137. Özdemir A, Turan-Zitouni G, Asim Z, Demirci F, Iscan G, Zdemir RAO, et al. Studies on hydrazone derivatives as antifungal agents. J Enzyme Inhib Med Chem. 2008; 1–7.
138. Krátký M, Bősze S, Baranyai Z, Stolaříková J, Vinšová J. Synthesis and biological evolution of hydrazones derived from 4-(trifluoromethyl)benzohydrazide. Bioorganic Med Chem Lett. 2017 Dec 1;27(23):5185–9.
139. Gandra RM, Mc Carron P, Fernandes MF, Ramos LS, Mello TP, Aor AC, et al. Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles. Front Microbiol. 2017 Jul 11; 8(JUL):1257.
140. Rocha DP, Ferreira Pinto G, Ruggiero R, De Oliveira CA, Guerra W, Soares Fontes AP, et al. Coordination of metals to antibiotics as a strategy to combat bacterial resistance [Internet]. Vol. 34, Quimica Nova. Sociedade Brasileira de Quimica; 2011. p. 111–8.
141. ZANVETTOR NT. COMPLEXOS METÁLICOS DE Pt(II), Pd(II) E Ag(I) COM O LIGANTE 2-TIOFEN-2. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS; 2016.
142. Piatek M, Sheehan G, Kavanagh K. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. Pathog Dis. 2020 Nov 1; 78(8).
143. Anjos MNV, Araújo-Neto LN de, Buonafina MDS, Neves RP, Souza ER de, Bezerra ICF, et al. Ocotea glomerata (Nees) Mez Extract and Fractions: Chemical Characterization, Anti-*Candida* Activity and Related Mechanism of Action. Antibiotics. 2020 Jul 1; 9(7):1–12.
144. Rocha L, Marston A, Auxiliadora M, Kaplan C, Stoeckli-Evans H, Thull U, et al. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. Phytochemistry. 1994;36(6):1381–5.
145. Zubrická D, Mišianiková A, Henzelyová J, Valletta A, De Angelis G, D'Auria FD, et al. Xanthenes from roots, hairy roots and cell suspension cultures of

- selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. Plant Cell Rep. 2015 Jul 21; 34(11):1953–62.
146. Jin YS. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. Vol. 29, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. Elsevier Ltd; 2019. p. 126589.
 147. Seleem D, Pardi V, Murata RM. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. Vol. 76, Archives of Oral Biology. Elsevier Ltd; 2017. p. 76–83.
 148. Souza-Moreira TM, Severi JA, Rodrigues ER, de Paula MI, Freitas JA, Vilegas W, et al. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (*Myrtaceae*) with antifungal activity. Nat Prod Res. 2019 Sep 2; 33(17):2579–82.
 149. Tocci N, D'Auria FD, Simonetti G, Panella S, Palamara AT, Debrassi A, et al. Bioassay-guided fractionation of extracts from *Hypericum perforatum in vitro* roots treated with carboxymethylchitosans and determination of antifungal activity against human fungal pathogens. Plant Physiol Biochem. 2013 Sep 1;70:342–7.
 150. Hadni H, Elhallaoui M. 3D-QSAR, docking and ADMET properties of aurone analogues as antimalarial agents. Heliyon. 2020 Apr 1;6(4):e03580.
 151. Ortiz CLD, Completo GC, Nacario RC, Nellas RB. Potential Inhibitors of Galactofuranosyltransferase 2 (GlfT2): Molecular Docking, 3D-QSAR, and In Silico ADMETox Studies. Sci Rep. 2019 Dec 1; 9(1):1–28.
 152. Deb PK, Al-Attraqchi O, Prasad MR, Tekade RK. Protein and Tissue Binding: Implication on Pharmacokinetic Parameters. Implication on Pharmacokinetic Parameters. In: Dosage Form Design Considerations: Volume I. Elsevier; 2018. p. 371–99.
 153. Mikov M, Đanić M, Pavlović N, Stanimirov B, Goločorbin-Kon S, Stankov K, et al. The Role of Drug Metabolites in the Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2017 Dec 1; 42(6):881–90.
 154. Correia MA, Monteflano PRO. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano PR, editor. Cytochrome P450. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 177–259.
 155. Nakajima M, Yoshida R, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. Drug Metab Dispos. 2001 Aug; 29(8):1110–3.
 156. Hu B, Joseph J, Geng X, Wu Y, Suleiman MR, Liu X, et al. Refined pharmacophore features for virtual screening of human thromboxane A2 receptor antagonists. Comput Biol Chem. 2020 Jun 1;86:107249.
 157. Björnsson ES. Hepatotoxicity by drugs: The most common implicated agents.

- Int J Mol Sci. 2016 Feb 6; 17(2).
158. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem*. 2015 May 14; 58(9):4066–72.
 159. Vedani A, Smiesko M. In Silico Toxicology in Drug Discovery — Concepts Based on Three-dimensional Models. *Altern to Lab Anim*. 2009 Nov 9; 37(5):477–96.
 160. Banerjee P, Siramshetty VB, Drwal MN, Preissner R. Computational methods for prediction of in vitro effects of new chemical structures. *J Cheminform*. 2016 Sep 29; 8(1):1–11.
 161. Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox: a web server for the *in silico* prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul 1; 42(W1):W53–8.

8. ANEXOS

8.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro / BR (CEUA-UFF, protocolo número 208/2012; 13 de dezembro de 2012 e protocolo número 7561040518; junho 14, 2018), conforme figuras 9 e 10 abaixo.

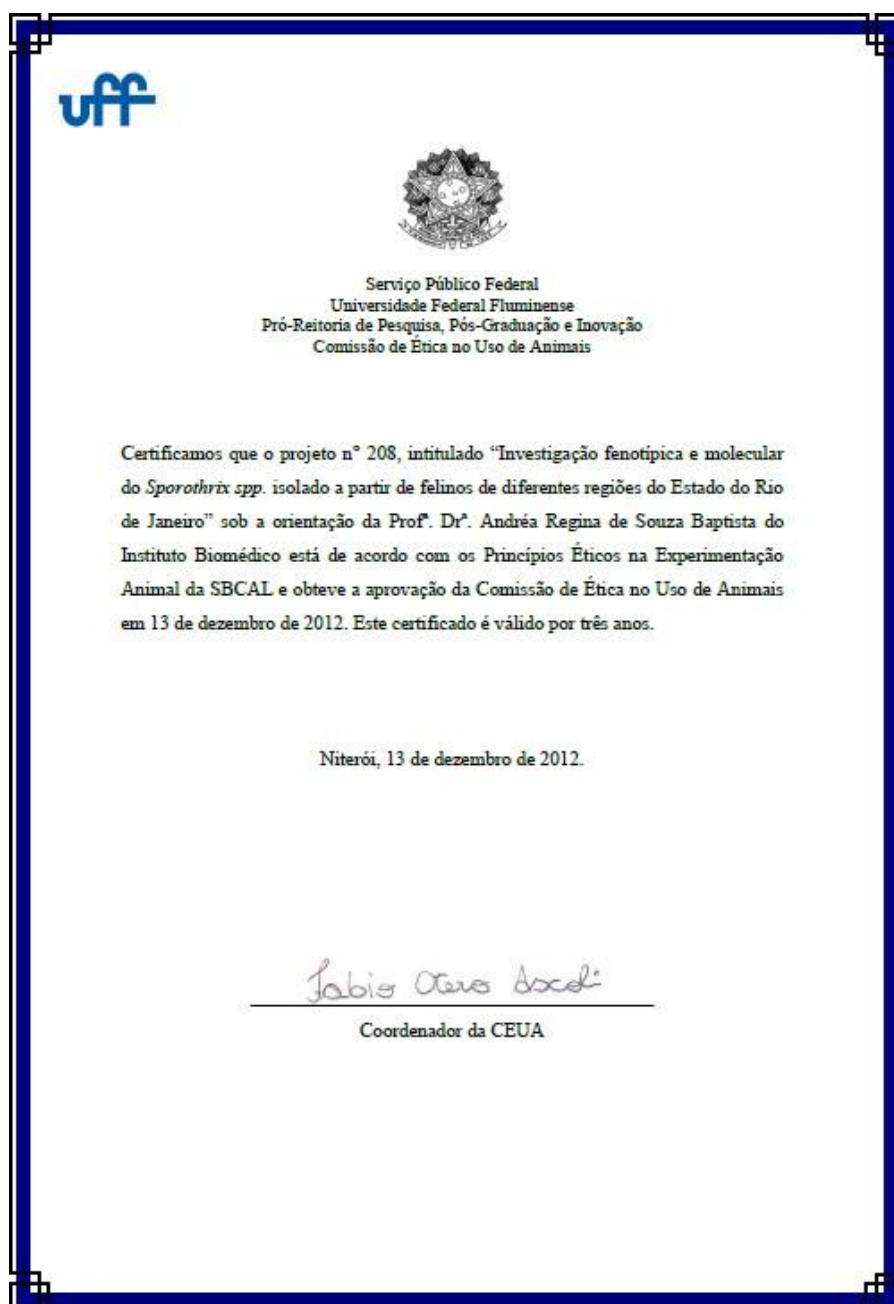


Figura 10: Imagem da Autorização do CEUA, protocolo 208/2012. Fonte: Arquivo CIM

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA, TERAPÊUTICA E DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA ESPOROTRICOSE FELINA", protocolada sob o CEUA nº 7561040518, sob a responsabilidade de **Andrea Regina de Souza Baptista** e equipe; *Ana Maria Dieckmann; Elisabeth Martins da Silva da Rocha; Gabriele Barros Mothe; Ricardo Pereira de Lucena; Simone da Rocha Leal da Silveira Souto; Aline Silva de Mattos Queiroz; Carla Stefany Isla Melivili; Rita de Cássia da Silva Machado Neves; Rozane Lessa da Silva; Ceci Ribeiro Leite* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 14/06/2018.

We certify that the proposal "CLINICAL-EPIDEMIOLOGICAL AND THERAPEUTIC EVALUATION PLUS PATHOGEN-HOST INTERACTION INVESTIGATION IN FELINE SPOROTRICHOSIS", utilizing 260 Cats (males and females), protocol number CEUA 7561040518, under the responsibility of **Andrea Regina de Souza Baptista** and team; *Ana Maria Dieckmann; Elisabeth Martins da Silva da Rocha; Gabriele Barros Mothe; Ricardo Pereira de Lucena; Simone da Rocha Leal da Silveira Souto; Aline Silva de Mattos Queiroz; Carla Stefany Isla Melivili; Rita de Cássia da Silva Machado Neves; Rozane Lessa da Silva; Ceci Ribeiro Leite* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 06/14/2018.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de *08/2018* a *08/2021*

Área: *Microbiologia*

Origem: *Animais de proprietários*

Espécie: *Gatos*

sexo: *Machos e Fêmeas*

Idade: *0 a 252 meses*

N: *260*

Linhagem: *SRD bem como animais de raça*

Peso: *1 a 8 kg*

Local do experimento: Laboratório de Micologia Médica e Veterinária do Instituto Biomédico da UFF Hospital Universitário de Medicina Veterinária Professor Firmino Mársico Filho da UFF Unidade de Diagnóstico de Referência em Esporotricose Animal - PMN/FMS/Niterói e UFF Clínicas veterinárias parceiras: S & S Animal Care (Penha) e Animal Health (Barra da Tijuca)

Niterói, 14 de junho de 2018



Prof. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense



Fabio Otero Ascoli
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

A coleção de autorização para fins acadêmicos, nº 13659-13, foi expedida pelo SisBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente). Todas as espécies vegetais foram cadastradas sob o nº A0D648D no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional (SISGEN).

8.2 Produções científicas

Resumo relacionado à tese apresentado em evento científico

III Semana Científica PPGMPA

Niterói/RJ, Outubro, 2017

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS SINTÉTICOS E NATURAIS FRENTE A ESPÉCIES PATOGÊNICAS DO GÊNERO *Sporothrix*

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA^{1*}; THAYANNE CALDAS SOUZA²; PÂMELLA ANTUNES DE MACÉDO-SALES¹; ELISABETH MARTINS DA SILVA DA ROCHA¹, HELENA CARLA CASTRO²; ANDRÉA REGINA DE SOUZA BAPTISTA¹ - ¹ Laboratório de Micologia Médica e Molecular (LMMI-UFF), Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro;² Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABiEMol), Depto de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. Contato: lais_vela@hotmail.com D1 - Micologia

INTRODUÇÃO: No estado do Rio de Janeiro os casos de esporotricose têm sido alarmantes, no qual mantém magnitude epidêmica da forma de transmissão pela via zoonótica pelo felino doméstico. O principal ator deste cenário é o *Sporothrix brasiliensis*, que se encontra em expansão geográfica no país, com casos descritos nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, e em alguns estados do Nordeste. Por outro lado, a sapronose por *S. globosa* no continente Asiático também preocupa, com epidemia de casos humanos descrita e alguns relatos de felinos, muito embora sem epizootia ou transmissão zoonótica documentada. A classe de antifúngicos utilizada como primeira escolha para o tratamento dessa zoonose negligenciada são os azóis sendo o Itraconazol a droga de eleição. Em casos não responsivos e/ou infecções sistêmicas graves, a Anfotericina B, pertencente a classe dos poliêns, é também utilizada. Até o presente momento, poucos relatos abordaram o perfil de susceptibilidade aos fármacos antifúngicos a partir de isolados oriundos da infecção felina, além de não haver pontos de cortes estabelecidos. Há poucos relatos na literatura que aborde a pesquisa de novos protótipos com possível atividade antimicrobiana independente da espécie do fungo, de seu hospedeiro ou mesmo de sua origem geográfica, relacionados a esporotricose. Assim, investigações

envolvendo a interação fungo-fármaco são essenciais para a proposição das melhores opções vigentes assim como para o desenvolvimento de novas estratégias e intervenções terapêuticas para o tratamento desta micose, cujo tratamento é dispendioso e de difícil administração. Ademais, já foram descritos isolados com sensibilidade reduzida aos principais fármacos passíveis de serem utilizados na prática clínica. **OBJETIVOS:** Prospectar ampla gama de derivados sintéticos e naturais a fim de pesquisar seu potencial antifúngico por meio da caracterização do perfil de sensibilidade de isolados clínicos do *Sporothrix* oriundos da epidemia zoonótica assim como de cepas padrão. **METODOLOGIA:** Para tanto, serão incluídos os seguintes isolados clínicos: HO 318, HO 354, HO 213, HO 355, HO 345, 01-I036, SS-048, 13-I005, 01-I002 e a cepa padrão da *American Type Culture Collection*, ATCC 5110 *S. brasiliensis*. Os derivados naturais isolados de plantas da restinga de Niterói e os novos derivados sintéticos da classe das quinolonas, naftoquinonas e pirazolona serão submetidos a uma triagem através do teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão, pela metodologia de Kirby-Bauer (M2-A8 CLSI, 2003) adaptada, na qual discos de papel de filtro embebidos com cada derivado e controles experimentais correspondentes serão utilizados. O derivado que apresentar um halo de inibição microbiana será qualificado e será submetido ao CIM, a fim de determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visível, comparando o perfil de susceptibilidade com os antifúngicos de uso clínico. Neste estudo, o mecanismo antifúngico com classificação como fungicida e/ou fungistático será determinado, bem como seus efeitos sobre a viabilidade celular das espécies clínicas, através da Curva de Morte e contagem de unidades formadoras de colônias com o auxílio da câmara de Neubauer. Por fim, através da microscopia eletrônica, a micromorfologia do fungo, após o tratamento com os derivados ativos, também será investigada. **RESULTADOS:** Até o momento 10 isolados clínicos e uma ATCC 5110 de *S. brasiliensis* foram investigados frente a 36 derivados de diferentes classes químicas como pirazolona: (16), quinolona (16) e naftoquinona (4); foram submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão. Nenhum deles apresentou atividades antimicrobiana nas formas de levedura ou conídio. **CONCLUSÃO:** Até o presente momento, os novos derivados de diferentes classes químicas testados não apresentaram atividade antifúngica frente os isolados clínicos de *Sporothrix* spp. testados. **PALAVRA-CHAVE:** *Sporothrix* spp., *Felis catus*, Antimicrobianos; Novos protótipos. **Apoio Financeiro:** FAPERJ, CAPES, CNPQ, PROPPI-UFF.

IV Semana Científica PPGMPA

Niterói/RJ, Novembro, 2018

ANTIFUNGAL POTENTIAL OF SYNTHETIC DERIVATIVES AGAINST PATHOGENIC SPECIES OF *Sporothrix*

SOUZA, LAIS C.S.V.^{1,2*}, SOUZA, THAYANNE C.², SALES, PÂMELLA A. M.¹, ROCHA, ELISABETH M. S.¹, CASTRO, HELENA C.², BAPTISTA, ANDRÉA R. S.¹

¹ Laboratory of Medical and Molecular Mycology (LMMI-UFF), Department of Microbiology and Parasitology - Biomedical Institute of Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro; ² Laboratory of Antibiotics, Biochemistry and

Molecular Modeling (LABiEMol), Department of Cellular and Molecular Biology - Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro. *lais_vela@hotmail.com, (22) 998965682 – D2

INTRODUCTION: In the state of Rio de Janeiro, cases of sporotrichosis maintain the epidemic magnitude of the zoonotic form via the domestic feline, with *Sporothrix brasiliensis* being the main actor. The antifungal used to treat this zoonosis is Itraconazole, expensive and difficult to administer to animals. **OBJECTIVE:** Prospecting a wide range of synthetic derivatives in order to investigate their *in silico* and *in vitro* antifungal potential of *Sporothrix* clinical isolates from the zoonotic epidemic. **METHODS:** Six clinical isolates and the standard strain ATCC 5110 - *S. brasiliensis* were included. The novel synthetic derivatives of the class of quinolones, naphthoquinones, pyrazolones, quinones and hydrazines were screened by the antimicrobial sensitivity test by disc diffusion using the Kirby-Bauer methodology (M2-A8 CLSI, 2003). The derivative which conferred halo corresponding to the microbial inhibition was qualified and subsequently investigated via microdilution in broth in order to determine the lowest concentration capable of inhibiting visible fungal growth (MIC). The *in silico* analysis aims at determining the pharmacological potential and the possible toxicological profile of the active derivatives. **RESULTS:** Among the 62 derivatives tested, 16 were active against different clinical samples tested in the form of yeast and an active derivative in the form of conidium. The obtained MICs ranged from 02 µg / mL to ≥ 128 µg / mL. *In silico* analysis showed that most of the active derivatives were promising in the pharmacological and toxicological parameters tested. **CONCLUSION:** New derivatives of the class of hydrazines and quinones are promising antifungal potentials. **KEYWORDS:** *Sporothrix* spp., *Felis catus*, New prototypes. **FUNDING:** FAPERJ, CAPES, CNPQ, PROPPI-UFF

V Semana Científica PPGMPA

Niterói/RJ, Outubro, 2019

SYNTHETIC AND NATURAL ANTIFUNGAL CANDIDATES AGAINST *Sporothrix brasiliensis*

SOUZA, LAIS C.S.V.^{1*}; MACÊDO-SALES, PÂMELLA A.¹; SOUZA, LUCIERI O.P.²; MOTHÉ, GABRIELLE B.¹; SANTOS, RENAN C.S.³; MACHADO, RICARDO LUIZ D.¹; ROCHA, ELISABETH M. S.¹; SANTOS, ANDRE LUIS S.²; ROCHA, LEANDRO M.³; CASTRO, HELENA CARLA⁴; BAPTISTA, ANDRÉA REGINA. S.^{1**} 1. Microorganisms Research Center (CIM), Department of Microbiology and Parasitology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ; 2. Laboratory of Advanced Studies of Emerging and Resistant Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; 3. Laboratory of Natural Products Technology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ. 4. Laboratory of Antibiotics, Biochemistry and

Molecular Modeling (LabieMol), Federal Fluminense University, Niterói, RJ. *e-mail: andrearegina@id.uff.br Phone: + 55 21 994067663.

INTRODUCTION: In the state of Rio de Janeiro, sporotrichosis maintains the hyperendemic magnitude of the zoonotic form via domestic feline transmission with *Sporothrix brasiliensis*, a dimorphic fungus, as the almost exclusively isolated species. Itraconazole is the drug of choice to treat this zoonosis, an expensive and difficult drug to be daily administered to cats. Furthermore, in the last few years, *in vitro* and *in vivo* evidence of *S. brasiliensis* resistance to this azole have been reported. **OBJECTIVES:** To prospect a wide range of synthetic derivatives and natural compounds in order to investigate *in vitro*, *in vivo* and *in silico* antifungal potential properties against *S. brasiliensis* clinical isolates obtained from diseased cats of the Brazilian hyperendemic area. **METHODS:** Both morphotypes of six *S. brasiliensis* clinical isolates from Niterói, RJ, and of the ATCC 5110 were tested. The novel synthetic derivatives of eight different chemical classes (pyrazole, pyrazolone, quinolone, quinone, naphthoquinone, hydrazine, N-phthalimide, and phenanthroline) and natural origin plant extracts (*Ocotea pulchella*, *Ocotea notata*, *Hypericum brasiliense* and *Myrciaria floribunda*) were firstly screened by disc diffusion (M2-A8 CLSI, 2003). The derivatives promoting halos compatible with microbial inhibition were subsequently investigated by broth microdilution (M27-A7 CLSI, 2002) in order to determine the lowest concentration capable of inhibiting visible fungal growth (MIC). Lastly, *in silico* analysis was performed SwissADME e admetSAR to determine pharmacological potentials and toxicological profiles of the active derivatives. **RESULTS:** Among the 88 derivatives, 19 were shown to be active (hydrazines, quinones and phenanthrolines classes and natural origin plant extracts) most clinical isolates and of the ATCC 5110 tested in the form of yeast and one of them was active against conidia. The obtained MICs ranged from 0.25 µg/mL to ≥ 128 µg/mL. *In silico* analysis showed that most of the active derivatives were promising in the pharmacological and toxicological parameters tested. **CONCLUSION:** Hydrazines, phenanthrolines and extracts of natural origin may constitute promising antifungals against *S. brasiliensis*. Additional experiments with the *Galleria melonella* invertebrate model are currently being conducted at CIM-UFF to investigate the *in vivo* potential of both natural and synthetic candidates. **KEYWORDS:** Sporotrichosis, *Felis catus*, Phenanthrolines. **FUNDING:** FAPERJ, CNPQ, PROPPI-UFF. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

VI Semana Científica Semana

Niterói/RJ 2020

SYNTHETIC AND NATURAL ANTIFUNGAL CANDIDATES AGAINST *Sporothrix brasiliensis* FROM THE BRAZILIAN EPIDEMICS

SOUZA, LAIS C.S.V.^{1*}; MACÊDO-SALES, PÂMELLA A.¹; SOUZA, LUCIERI O.P.²; MOTHÉ, GABRIELLE B.¹; SANTOS, RENAN C.S.³; MACHADO, RICARDO LUIZ D.¹; ROCHA, ELISABETH M. S.¹; SANTOS, ANDRE LUIS S.²; ROCHA, LEANDRO

M.³; CASTRO, HELENA CARLA⁴; BAPTISTA, ANDRÉA REGINA. S.^{1**} 1. Microorganisms Research Center (CIM), Department of Microbiology and Parasitology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ; 2. Laboratory of Advanced Studies of Emerging and Resistant Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; 3. Laboratory of Natural Products Technology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ. 4. Laboratory of Antibiotics, Biochemistry and Molecular Modeling (LabiMol), Federal Fluminense University, Niterói, RJ. *e-mail: andrearegina@id.uff.br Phone: + 55 21 994067663.

INTRODUCTION: *Sporothrix brasiliensis* is a dimorphic fungus, the causative agent of sporotrichosis in Brazil. Itraconazole is the drug of choice to both feline and human treatment although expensive and difficult to be daily administered to cats. *S. brasiliensis* resistance to this azole was reported. **OBJECTIVES:** To prospect a wide range of synthetic derivatives and natural compounds by *in vitro*, *in vivo* and *in silico* testing of antifungal properties against *S. brasiliensis* obtained from diseased cats of the Brazilian hyperendemic area. **METHODS:** Both morphotypes of six *S. brasiliensis* clinical isolates and of the ATCC 5110 were tested. Novel synthetic derivatives of eight distinct chemical classes (pyrazole, pyrazolone, quinolone, quinone, naphthoquinone, hydrazine, N-phthalimide, and phenanthroline) and natural extracts from Brazilian restinga plants (*Ocotea* spp., *Hypericum brasiliense* and *Myrciaria floribunda*) were screened by disc diffusion (M2-A8 CLSI,2003) and, subsequently, by broth microdilution (M27-A7 CLSI,2002). Pharmacological potentials and toxicological profiles were investigated by *in silico* analysis (SwissADME/admetSAR). **RESULTS:** Twenty-one percent of all derivatives (19/88; hydrazines, quinones and phenanthrolines plus natural extracts) were active against the yeasts of the majority of all isolates while one of them was active against conidia. MICs ranged from 0.25 µg/mL to ≥ 128 µg/mL. *In silico* analysis showed that most of the derivatives were potential antifungals. **CONCLUSION:** Hydrazines, phenanthrolines and restinga plant extracts are potential antifungals against *S. brasiliensis*. Additional experiments with the *Galleria melonella* invertebrate model are currently being conducted at CIM-UFF to investigate *in vivo* performances for both natural and synthetic antifungal candidates. **KEYWORDS:** Sporotrichosis, *Felis catus*, Phenanthrolines. **FUNDING:** FAPERJ, CNPQ, PROPPI-UFF. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Resumo relacionados à tese a ser apresentado em eventos científicos

International Conference on Microbiology & Infectious Diseases
Roma – Itália, Novembro, 2021

Synthetic and Natural Antifungal Candidates against *Sporothrix brasiliensis* from the Brazilian epidemics

Lais Cavalcanti dos Santos Velasco de Souza^{1*}, Pâmella Antunes de Macêdo Sales¹, Gabriela Mothé¹, Ricardo Luiz Dantas Machado¹; Elizabeth Martins da Silva da Rocha¹, André Luis dos Santos², Leandro Machado Rocha³, Helena Carla Castro⁴, Andrea Regina de Souza Baptista¹. ¹ Center for Microorganisms' Investigation, Federal Fluminense University, Niterói, RJ, Brazil; *presenting author; ²Laboratory of Advanced Studies of Emerging and Resistant Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³ Natural Products Technology Laboratory, Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University - Niterói, RJ, Brazil; ⁴ Laboratory of Antibiotics, Biochemistry and Molecular Modeling, Institute of Biology, Federal Fluminense University - Niterói, RJ, Brazil.

Abstract: Sporotrichosis is a neglected zoonosis in Brazil, with a hyperendemic character in the state of RJ, with *Sporothrix brasiliensis* being the causative agent of this disease that affects cats and humans. In view of the recent continental expansion and the well-known geographical distribution of sporotrichosis in Brazil, combined with difficulties on domestic feline effective treatment and the pressing need for therapeutic alternatives, this work aimed at prospecting a range of synthetic derivatives and natural extracts to evaluate *in vitro* potential antifungal properties against isolates of *Sporothrix brasiliensis* from cats residing in the hyperendemic Brazilian region. Six *S. brasiliensis* isolates originated from sporotrichotic lesions in domestic cats were included. Cats included average age 3,58 years, most with street access and treatment with itraconazole ranging from 2 to 60 months in a dosage of 100 mg/cat/day. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the three novel hydrazone derivatives, eleven novel quinone derivatives, three chelates and four natural extracts were determined using the broth microdilution method. All synthetic derivatives and natural extracts were also evaluated for minimum fungicidal concentration (MFC). MICs and MFCs ranged from 1 - >128 µg/ml and 0,03 – 0,002 µM. *In silico* tests were used to predict the pharmacological profile and toxicity parameters of the synthetic derivatives. The ADMET computational analysis did not show toxicity while a good pharmacological predictive profile, with parameters similar to itraconazole, was obtained. In view of the data found, we conclude that three hydrazone derivatives, three chelates and natural extracts, mainly *Ocotea pulchella* and

Myrciaria floribunda, are promising candidates for antifungal agents. **Keywords:** Sporotrichosis, *Felis catus*, quinones, hydrazones, chelates, natural extracts.

Resumos não relacionados à tese apresentados em eventos científicos

SILVA, LETICIA S.S.1, RAMIREZ, AÍNA D.R.1, SOUZA, LAIS C.S.V.1, BOTELHO, LUIZ G.X.1, CASTRO, VITÓRIA F. 1, CARDOSO, CYNTHIA², FERREIRA, JOSELI O.3, MALO, LUCIANE M.S.4 BAPTISTA, ANDRÉA R. S.1, MACHADO RICARDO LD.1. THE INFLUENCE OF TREM-1 GENE RECEPTOR POLYMORPHISM (TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS I). In sustainability to malaria by *Plasmodium vivax* in an endemic area of brazilian amazon. V Semana científica do PPGMPA/UFF, 2019.

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA^{1,2,4}; LETICIA SANTOS SAULES SILVA², ⁴GABRIELA SARAMAGO GOMES DE AZEVEDO^{2, 3}; BRUNO FERREIRA LEAL^{2, 3}; MARCOS VEIGA KALIL⁵; DANIELA LUNA MARTINS⁶; ANDRÉA REGINA DE SOUZA BAPTISTA¹; HELENA CARLA CASTRO^{2, 3, 4}. Identificação do potencial antifúngico dos derivados sintéticos das diferentes classes químicas frente a cepas padrão atcc do gênero *Candida*. XXIII Semana de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ, 2017.

Artigos científicos publicados não relacionados a tese

LAIS CAVALCANTI, LETÍCIA SAULES, GABRIELA SARAMAGO, BRUNO LEAL, ANDREA REGINA S BAPTISTA, VANESSA GREMIÃO DOS SANTOS, MARCOS KALIL, ALBA REGINA DE MAGALHÃES, PAULA ALVAREZ ABREU AND HELENA C CASTRO. Understanding the morphogenesis and pathogenicity of *Candida albicans*: A way to interfere and develop new antifungals *Candida albicans* morphogenesis and pathogenicity: understanding to interfere. Advances in Biotechnology & Microbiology, 2019.

JULIANA S. NOVAIS, ALINE C. ROSANDISKI, CAROLINA M. DE CARVALHO, LETÍCIA S. DE SAULES SILVA, LAIS C. DOS S. VELASCO DE SOUZA, MARCOS V. SANTANA, NATHALIA R.C. MARTINS, HELENA C. CASTRO, VITOR F. FERREIRA, DANIEL T.G. GONZAGA, GABRIEL O. DE RESENDE2, AND FERNANDO DE C. DA SILVA. Efficient Synthesis and Antibacterial Profile of Bis(2-hydroxynaphthalene1,4-dione). *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019.

ALINE DA R. LOUVIS, NAYANE A. A. SILVA, FELIPE S. SEMAAN, FERNANDO DE C. DA SILVA, GABRIELA SARAMAGO, LAIS C. S. V. DE SOUZA, BRUNO L. A. FERREIRA, HELENA C. CASTRO, JULIANA P. SALLES, ANDRÉ L. A. SOUZA, ROBSON X. FARIA, VITOR F. FERREIRA AND DANIELA DE L. MARTINS. Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones – green palladium-catalysed Suzuki cross coupling. *New Journal. Chemistry*, 2016.

8.3. Orientações Acadêmicas

Coorientação mestrado

Aluna: Letícia Santos de Saules Silva

Programa de Patologia geral/UFF; Período: 2017-2019

Título do Trabalho: Identificação do potencial antifúngico de compostos sintéticos e naturais frente às cepas de referência do gênero *Candida*.

Coorientação em curso de especialização

Aluna: Letícia Santos de Saules Silva

Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* Ciências do Laboratório Clínico – UFRJ;

Período: 2017-2018

Título do Trabalho: Análise comparativa do perfil antifúngico e antibiofilme de compostos sintéticos frente as cepas padrão ATCC do gênero *Candida*.

Orientação de iniciação científica

Alunas: Thayane Caldas Souza; Período: 02/2017 – 03/2018; Curso: Farmácia (Centro Universitário Anhanguera- Niterói/RJ).

Sthefany da Conceição Pires; Período: 12/2017 – 07/2019; Curso: Biomedicina
(Centro Universitário Anhanguera- Niterói/RJ).