Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Romulo Pereira de Moura Sousa

Análise da atividade antifúngica *in vitro* de 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* provenientes de um Hospital Universitário

João Pessoa-PB
2019

Romulo Pereira de Moura Sousa

Análise da atividade antifúngica *in vitro* de 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* provenientes de um Hospital Universitário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa-PB

2019

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725a Sousa, Romulo Pereira de Moura.
Análise da atividade antifúngica in vitro de 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de Candida provenientes de um Hospital Universitário / Romulo Pereira de Moura Sousa. - João Pessoa, 2019.
39 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Candida albicans. 2. Complexo Candida parapsilosis. 3. Candidíase Invasiva. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

ROMULO PEREIRA DE MOURA SOUSA

Análise da atividade antifúngica *in vitro* de 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* provenientes de um Hospital Universitário

Aprovado. João Pessoa – PB. Data de aprovação: 14 / 06 / 2019

Banca examinadora

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Orientadora)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
(Membro interno)

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra
(Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Ao longo de minha trajetória estudantil, em especial, a acadêmica, tive o privilégio e a graça de encontrar pessoas mais que especiais, sem as quais não teria logrado meus objetivos e sonhos, dentre eles, o momento que estou vivendo agora. Dessa forma, agradeço imensuravelmente:

À minha mãe Naurizete, ao meu pai Romualdo e ao meu irmão Ramilo, por terem sido meu alicerce ao longo da minha vida;

À minha amada esposa Neuma Porcino, por tamanha dedicação, incentivo e suporte para que eu iniciasse e finalizasse essa conquista;

À minha orientadora Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima pela oportunidade de ter sido seu orientando, pelo carinho e pelos imensos ensinamentos que foram dedicados a mim;

Aos amigos do laboratório de pesquisa, em especial, Daniele de Figueredo, que me ajudou por vários e vários dias de pesquisa;

Aos meus amigos do curso de mestrado da UFPB, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e cumplicidade nos dias difíceis;

Aos professores do curso de mestrado da UFPB pelos ensinamentos e pelo profissionalismo dedicados a nós;

À professora Dra. Zélia Braz pela amizade, incentivo e parceria durante toda minha passagem nessa instituição que tanto me orgulho;

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, em especial Caroline Mangueira, pelo alto nível de compromisso e atenção dedicados as necessidades dos discentes;

A todos os meus amigos que sempre acreditaram, incentivaram e torceram por mim;

Por fim, e de forma intencional, agradeço a DEUS, a nossa santa mãe Maria, ao senhor Jesus Cristo e ao meu Santo Anjo Protetor por sempre estarem comigo, me orientando, me iluminando, me dando forças nos inúmeros dias e madrugadas dedicadas aos estudos, dedicadas aos meus sonhos e objetivos. Obrigado meu Deus por mais uma graça, por sempre colocar pessoas especiais em minha caminhada.

RESUMO

SOUSA, R. P. M. **Análise da atividade antifúngica *in vitro* de 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* provenientes de um Hospital Universitário**. 2019. Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

A candidíase sistêmica, também conhecida como candidíase invasiva, é uma infecção fúngica oportunista provocada por leveduras do gênero *Candida*. A forma invasiva é a manifestação mais grave em decorrência de sua disseminação para outros órgãos, promovendo hospitalização prolongada e altas taxas de morbimortalidade. O tratamento para essa infecção grave ainda dispõe de um pequeno arsenal terapêutico, o qual se resume em três classes: agentes triazólicos, as equinocandinas e os polienos. Embora os fármacos de primeira linha (agentes triazólicos e as equinocandinas) sejam eficazes, algumas espécies de *Candida* são naturalmente resistentes e outras desenvolvem resistência adquirida, esta última vem ocorrendo de forma crescente e causando uma grande preocupação devido ao surgimento da multirresistência fúngica. Diante desse quadro preocupante, a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas tem sido constante, e uma das fontes de substâncias potencialmente ativas são os compostos sintéticos. Destarte, com base no potencial farmacológico das substâncias sintéticas, este estudo investigou a atividade antifúngica *in vitro* do composto sintético 2-bromo-*N*-fenilacetamida através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), frente às espécies de *Candida* isoladas de pacientes com candidíase invasiva assistidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley, João Pessoa-PB, no ano de 2017. Ademais, identificou os agentes etiológicos e seus perfis de sensibilidade através do *Kit* comercial Candifast®, comparou com a identificação realizada através de métodos laboratoriais, e por fim, avaliou a associação da substância teste com o fluconazol. Assim sendo, a presente pesquisa revelou que foram diagnosticados 25 casos de candidíase invasiva, dos quais, 56% foram provenientes de pacientes internos nas unidades de terapia intensiva do citado hospital, tendo a espécie *C. albicans* como agente etiológico mais comum (52%), e que, dos 15 isolados clínicos escolhidos para dar seguimento a esta pesquisa, 47% foram resistentes ao fluconazol, dos quais, seis (06) isolados de *C. albicans* e um (01) do complexo *C. parapsilosis*. Nos ensaios de atividade antifúngica, a substância teste apresentou CIM_{50} de 8 µg/mL para *C. albicans* e 16 µg/mL para o complexo *C. parapsilosis*, e CFM_{50} de 16 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente. A associação entre a 2-bromo-*N*-fenilacetamida com o fluconazol não apresentou sinergismo ou antagonismo, sendo caracterizada como indiferente. Portanto, o presente estudo revelou que no ano de 2017, a maioria dos casos de candidíase invasiva foi proveniente de pacientes internos no centro de terapia intensiva do referido hospital universitário, tendo a espécie *C. albicans* como agente etiológico mais comum e o fluconazol como único fármaco do kit Candifast® que apresentou resistência (47%). Além disso, este foi o primeiro estudo com a substância sintética 2-bromo-N-fenilacetamida, a qual mostrou uma forte atividade fungicida contra isolados clínicos de *C. albicans* e do complexo *C. parapsilosis*, no entanto, tal substância se mostrou indiferente quando associada com o fluconazol.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Complexo *Candida parapsilosis*. Candidíase Invasiva.

ABSTRACT

SOUSA, R. P. M. **Analysis of the in vitro antifungal activity of 2-bromo-N-phenylacetamide against Candida species from a University Hospital**. 2019. Master's Degree – Program of Postgraduate in Natural and Synthetics Bioactive Products, Federal University of Paraíba.

Systemic candidiasis, also known as invasive candidiasis, is an opportunistic fungal infection caused by yeasts of the genus *Candida*. The invasive form is the most serious manifestation due to its spread to other organs, promoting prolonged hospitalization and high morbidity and mortality rates. The treatment for this severe infection still has a small therapeutic arsenal, which is summarized in three classes: triazolic agents, the echinocandins and the polyenes. Although the first-line drugs (triazolic agents and echinocandins) are effective, some *Candida* species are naturally resistant and others develop acquired resistance, the latter having been occurring increasingly and causing great concern due to the appearance of fungal multiresistance. Faced with this worrying picture, the search for new pharmacotherapeutic alternatives has been constant, and one of the sources of potentially active substances are the synthetic compounds. Based on the pharmacological potential of the synthetic substances, this study investigated the in vitro antifungal activity of the synthetic compound 2-bromo-N-phenylacetamide by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM) of *Candida* isolates from patients with invasive candidiasis assisted at the Lauro Wanderley University Hospital, João Pessoa-PB, in the year 2017. In addition, it identified the etiological agents and their sensitivity profiles through the Candifast® Kit, compared to the identification performed through laboratory methods, and finally assessed the association of the test substance with fluconazole. Thus, the present study revealed that 25 cases of invasive candidiasis were diagnosed, of which 56% were from patients in the intensive care unit of the hospital, and *C. albicans* was the most common etiological agent (52%), and that of the 15 clinical isolates chosen to follow up on this research, 47% were resistant to fluconazole, of which six (06) isolates of *C. albicans* and one (01) of the *C. parapsilosis* complex. In the antifungal activity assays, the test substance had CIM_{50} of 8 μg/mL for *C. albicans* and 16 μg/mL for *C. parapsilosis* complex, and CFM_{50} of 16 μg/mL and 32 μg/mL, respectively. The association between 2-bromo-N-phenylacetamide and fluconazole did not show synergism or antagonism, being characterized as indifferent. Therefore, the present study revealed that in the year 2017, the majority of cases of invasive candidiasis came from inpatients in the intensive care unit of the university hospital, with *C. albicans* as the most common etiological agent and fluconazole as the only Candifast® kit which showed resistance (47%). In addition, this was the first study with the synthetic substance 2-bromo-N-phenylacetamide, which showed a strong fungicidal activity against clinical isolates of *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex, however, this substance was indifferent when associated with fluconazole.

Keywords: *Candida albicans*. *Candida parapsilosis* complex. Invasive candidiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - variação geográfica da distribuição de *Candida* spp. não-*albicans* **14**
Figura 2 - Reação de síntese da 2-bromo-N-fenilacetamida **18**
Figura 3 - Frequência comparativa dos casos de candidíase sistêmica diagnosticados nas diferentes unidades de internação do HULW no ano de 2017 ..... **24**
Figura 4 - Fotografia exibindo as análises do *Kit* Candifast® **25**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das leveduras utilizando o método comercial Candifast® versus a identificação feita por métodos laboratoriais tradicionais (Laboratório de Micologia - UFPB) **26**

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos e das cepas ATCC aos antifúngicos do *kit* Candifast® (International Microbio, França) **27**

Tabela 3 - Concentrações Inibitórias Mínimas e Concentrações Fungicidas Mínimas da 2-bromo-N-fenilacetamida sobre os isolados clínicos e cepas de *C. albicans* e complexo *C. parapsilosis* **29**

Tabela 4 - Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre 2-bromo-N-fenilacetamida e fluconazol sobre os isolados clínicos de *C. albicans* e complexo *C. parapsilosis* **31**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

mL - mililitro

g - grama

FTIR - Fourier-transform infrared spectroscopy

RMN ^{1}H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

MHz – mega-hertz

K_2CO_3 – carbonato de potássio

$CHCl_3$ – clorofórmio

TA – Temperatura ambiente

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

HULW – Hospital Universitário Lauro Wanderley

ICIF - Índice de Concentração Inibitória Fracionada

DCF – Departamento de Ciências Farmacêuticas

CCS – Centro de Ciências da Saúde

DMSO – Dimetilsulfóxido

ASD - Agar Sabouraud Dextrose

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

ATCC – American Type Culture Collection

NaCl – Cloreto de sódio

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UI – Unidade Internacional

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

CIF - Concentração Inibitória Fracionada

CIM_{50} - Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras fúngicas

CFM_{50} - Concentração Fungicida Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras fúngicas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
2. REFERENCIAL TEÓRICO 11
2.1 Gênero *Candida* e Candidíase **11**
2.2 Farmacoterapia da candidíase invasiva **15**
2.3 Produto sintético: 2-bromo-N-fenilacetamida **17**
3. OBJETIVOS 18
3.1 Objetivo geral **18**
3.2 Objetivos específicos **19**
4. METODOLOGIA 19
4.1 Local da pesquisa **19**
4.2 Substâncias **19**
4.3 Meios de cultura **20**
4.4 Isolados Clínicos e Cepas fúngicas **20**
4.5 Inóculo **20**
4.6 Identificação e perfil de sensibilidade das leveduras através do Candifast® **21**
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) **21**
4.8 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM**)** **22**
4.9 Ensaio de associação através do método *checkerboard* **22**
4.10 Análise Estatística **23**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23
6. CONCLUSÕES 32
REFERÊNCIAS 34

1. INTRODUÇÃO

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista provocada por leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, composto por mais de 200 espécies (HOOG; GENE; FIGUERAS, 2011; SILVA et al., 2012), das quais, *C. albicans*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* são as mais frequentes na clínica (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; PAPPAS et al., 2018; SIDRIM; ROCHA, 2004). *Candida* spp. é responsável por uma gama de enfermidades, que abrange desde uma simples lesão cutâneo-mucosa até infecções sistêmicas, também conhecidas como candidíase invasiva, sendo esta a manifestação mais grave, pois, pode apresentar uma sintomatologia localizada que se dissemina para outros órgãos por via hematogênica, ou ainda, uma infecção de origem exógena via dispositivos intravasculares com posterior disseminação (PAPPAS et al., 2018; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A maioria das infecções é provocada por *C. albicans* ou *C. tropicalis* (LIMA et al., 2017; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). O estudo global ARTEMIS (programa global de vigilância antifúngica) isolou 256.882 casos de *Candida* spp. obtidas de 142 centros médicos de 41 países, e detectou com mais frequência *C. albicans* (65,3%) (PFALLER et al., 2010). Porém, pode-se dizer que a epidemiologia da candidíase invasiva, quanto a seus agentes etiológicos, tem sofrido alterações, pois, nos últimos anos, houve um aumento dos casos provocados por espécies de *Candida* não-*albicans*, muias vezes, isoladas com mais frequência (BABADY, 2016). Um estudo brasileiro, conduzido em 16 hospitais distribuídos em cinco regiões do Brasil identificou uma frequência de 65,7% de espécies de *Candia* não-*albicans* em infecções de corrente sanguínea, sendo complexo *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%) as espécies mais isoladas (DOI et al., 2016). Na Nigéria, uma pesquisa de coorte prospectiva identificou que essas espécies também foram os agentes etiológicos mais comuns em infecções do trato urinário (IWUAFOR et al., 2016).

A farmacoterapia disponível para tratamento sistêmico de infecções por *Candida* inclui os agentes triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, ravuconazol e albaconazol), as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), os polienos (anfotericina B convencional e suas formulações lipídicas) e a flucitosina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FUCHS; WANNMACHER, 2014; RANG et al., 2016). Embora os fármacos de primeira linha (agentes triazólicos e as equinocandinas) sejam eficazes, algumas espécies de *Candida* são naturalmente resistentes aos mesmos, é o caso de *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. fermentati* resistentes ao fluconazol, ou então, desenvolvem resistência adquirida, é o caso de *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae*

(ARENDRUP; PATTERSON, 2017; CHENG et al., 2016; LOCKHART et al., 2017; PAPPAS et al., 2018). Outra preocupação diz respeito ao surgimento da multirresistência fúngica, especialmente para *Candida glabrata* e *Candida auris*, representando uma ameaça global (PAPPAS et al., 2018).

Apesar dos avanços na assistência dos pacientes criticamente doentes, a candidíase invasiva ainda promove uma hospitalização prolongada, com taxa de mortalidade bruta em torno de 50%, sinalizando a necessidade de melhorar as práticas clínicas, incluindo diagnóstico precoce, controle do foco e farmacoterapia antimicótica precisa (DOI et al., 2016). Porém, devido às limitações dos antifúngicos existentes atualmente na clínica e à resistência apresentada pelas espécies de *Candida*, a busca por novas alternativas terapêuticas tem sido constante (HII et al., 2019; JOSÉ et al., 2019), e uma das fontes de substâncias potencialmente ativas são os compostos sintéticos (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010; SAMPAIO et al., 2014).

Nesse contexto, a molécula 2-bromo-N-fenilacetamida, sintetizada no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) com base em vias sintéticas já publicadas (XIE et al., 2007), foi utilizada nos ensaios de atividade biológica por ter apresentado melhor atividade antifúngica após a aplicação de uma triagem realizada com nove substâncias (mirtenol, p-cimeno, mentona, amida 6, amida 15, A7, A8, A14 e 2-bromo-N-fenilacetamida).

Portanto, com base no potencial farmacológico das substâncias sintéticas, este estudo teve como principal objetivo investigar a atividade antifúngica *in vitro* do composto sintético 2-bromo-N-fenilacetamida, frente a espécies de *Candida*, bem como verificar sua associação com antifúngico utilizado na clínica com a perspectiva de identificar uma ferramenta farmacológica que possa ter utilidade no combate da candidíase invasiva.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Candida* e Candidíase

Pertencente ao Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hemiascomycetes, Ordem Saccharomycetales e Família Saccharomycetoceae, este gênero possui uma composição bastante heterogênea, compreendendo mais de 200 espécies de organismos leveduriformes eucarióticos (HOOG; GENE; FIGUERAS, 2011; SILVA et al., 2012), porém, algumas espécies, como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* são

polimórficas, ou seja, crescem tanto na forma de leveduras quanto na forma filamentosa (WHEELER; LIMON; UNDERHILL, 2017). *C. albicans*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* são as espécies mais frequentemente implicadas em quadros clínicos, além de outras que também podem ser isoladas, como *C. lusitaniae*, *C. rugosa* e *C. guilllermondii* (JAWETZ et al, 1991; SCHAECHTER et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

O habitat da *C. albicans*, entre outras espécies do gênero, é bastante amplo, estando associado à espécie humana e às espécies de primatas. No homem, tem como habitat a pele, a mucosa das vias respiratórias, a mucosa digestiva e a mucosa do trato geniturinário. Na natureza é uma condição excepcional, e quando ocorre, geralmente está relacionado a uma contaminação (JAWETZ et al, 1991; SCHAECHTER et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; WHEELER; LIMON; UNDERHILL, 2017) ou a uma adaptação devido a versatilidade das espécies do gênero *Candida* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A candidíase ou candidose, termo genérico utilizado para denominar as doenças causadas pelas leveduras do gênero *Candida*, é uma infecção fúngica oportunista muito frequente. Por muito tempo, acreditava-se que apenas *C. albicans* tinha a capacidade de provocar enfermidade no homem, entretanto, já é de conhecimento da comunidade científica que pelo menos 15 espécies do gênero também são capazes de desencadear infecções (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; PAPPAS et al., 2018; SIDRIM; ROCHA, 2004; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

Os quadros clínicos dessa infecção fúngica são bastante variáveis, podendo ser divididos em candidíase cutâneo-mucosa, candidíase alérgica e candidíase sistêmica, sendo esta última a manifestação mais grave, apresentando uma sintomatologia localizada que se dissemina para outros órgãos por via hematogênica, ou ainda, uma infecção com origem exógena com disseminação, a exemplo, infecção de corrente sanguínea (candidemia) através de dispositivos intravasculares (SIDRIM; ROCHA, 2004). Na literatura, também ocorre a denominação candidíase invasiva, termo este que está relacionado a infecções graves causadas por espécies de *Candida*, como exemplo, candidemia, infecção do trato urinário, endocardite, abscesso, peritonite, osteomielite, dentre outras (PAPPAS et al., 2018).

C. albicans, assim como outras espécies, é uma levedura patogênica, porém oportunista, isto é, requer que o sistema de defesa do seu hospedeiro não esteja íntegro o suficiente para que o fungo, bem como outros micro-organismos, instaure uma colonização, e posteriormente, o dano tecidual. Vários fatores contribuem negativamente para a integridade da defesa do hospedeiro, dessa forma, facilitando a colonização, é o caso de quadro de imunossupressão transitória (uso de corticosteroides) ou imunossupressão permanente

(síndrome da imunodeficiência adquirida), uso de antibioticoterapia de amplo espectro, pacientes com neutropenia, dentre outros (JAWETZ et al, 1991; SCHAECHTER et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). A aplicação de tratamentos mais agressivos como transplante de células-tronco hematopoiéticas, transplante de órgãos sólidos, novos agentes antineoplásicos e imunomoduladores têm aumentado ainda mais o número de pacientes imunocomprometidos com risco de contrair infecção fúngica invasiva. Ademais, o uso crescente de dispositivos invasivos, especialmente catéteres intravasculares centrais, também tem possibilitado o aumento do número de infecções de correntes sanguíneas causadas pela *Candida* spp. (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

Diante de uma perturbação da microbiota da mucosa intestinal e/ou enfraquecimento da imunidade do hospedeiro, ocorre uma queba do equilíbrio que permite a permuta do comensalismo para o oportunismo, o qual está associado à indução de fatores de virulência. Há três condições principais que predispõe à candidíase invasiva, a primeia delas é o uso prolongado e/ou repetido de antibacterianos de amplo espectro que permitem o supercrescimento das espécies do gênero *Candida* na mucosa intestital motivado pela ausência de fatores de proteção anti-C*andida* não produzidos devido à depleção das bacterias comensais. A segunda condição é a quebra das barreiras gastrintestinais e cutâneas pela mucosite induzida por quimioterapia citotóxica, cirurgia gastrointestinal ou perfuração e/ou cateteres venosos centrais que permitem que *Candida* spp. transloque de locais mucocutâneos para a corrente sanguínea. Por fim, e não menos importante, a imunossupressão que prejudica as defesas do sistema imune inato nos tecidos e facilita a invasão da corrente sanguínea para órgãos como o fígado, baço, rins, coração e cérebro (KULLBERG; ARENDRUP, 2015; PAPPAS et al., 2018).

Dentre os patógenos fúngicos, *Candida* spp. é o agente etiológico mais comum em infeções graves (BABADY, 2016; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016), notadamente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Em muitos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, a candidemia está entre as quatro causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, com uma estimativa de 46 mil casos/ano e um custo de 35.000 a 68.000 dólares por episódio (PAPPAS et al., 2018; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). Essa forma invasiva acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, e normalmente, apresenta origem endógena, pois, algumas espécies de *Candida*, em especial *C. albicans*, faz parte da microbiota humana (BABADY, 2016; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

A maioria das infecções é provocada por *C. albicans* ou *C. tropicalis*, entretanto, *C. glabrata* está bastante envolvida em candidemias, infecção do trato urinário, e

ocasionalmente, pneumonia ou outra doença focal (LIMA et al., 2017; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). O estudo de vigilância global ARTEMIS isolou 256.882 casos de *Candida* spp. obtidas de 142 centros médicos de 41 países, e detectou, com mais frequência *C. albicans* (65,3%) (PFALLER et al., 2010). Porém, nos últimos anos, a epidemiologia da candidemia tem sinalizado um aumento dos casos provocados por espécies não-*albicans*, muias vezes, isoladas com mais frequência (Figura 1) (BABADY, 2016; PAPPAS et al., 2018).

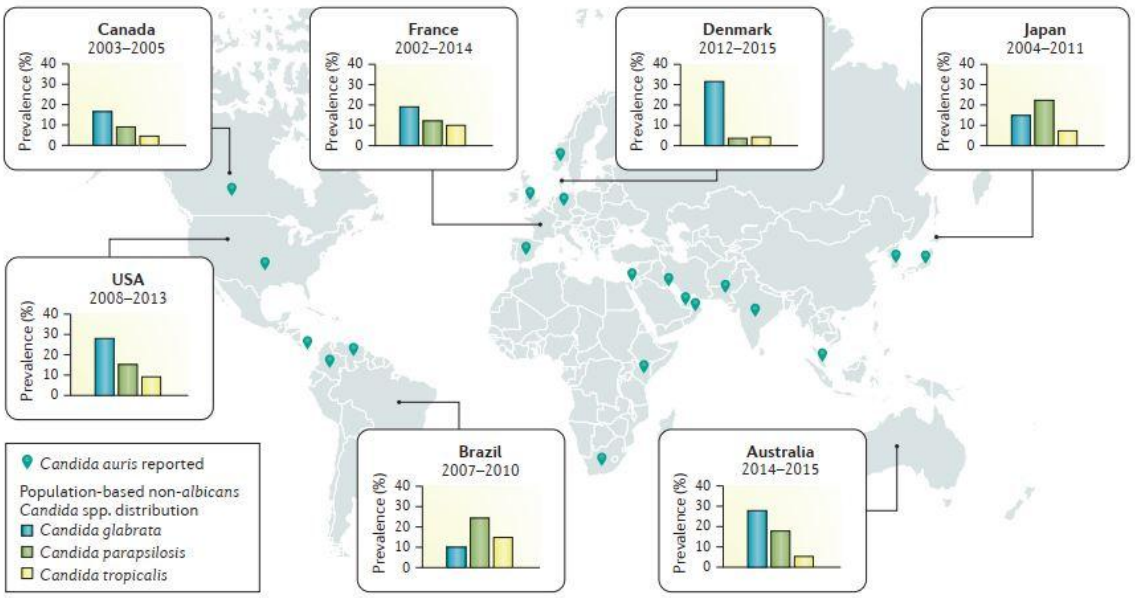

Figura 1: variação geográfica da distribuição de *Candida* spp. não-*albicans*.

Fonte: Pappas e colaboradores, 2018.

Um estudo brasileiro, conduzido em 16 hospitais distribuídos em cinco regiões do Brasil identificou uma frequência de 65,7% de *Candida* não-*albicans* em infecções de corrente sanguínea, sendo complexo *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%) as espécies mais isoladas (DOI et al., 2016). Na Nigéria, uma coorte prospectiva identificou que as espécies não-*albicans* também foram os agentes etiológicos mais comuns em infecções do trato urinário (IWUAFOR et al., 2016).

Apesar dos avanços na assistência médica para pacientes criticamente doentes, a candidíase ainda promove uma hospitalização prolongada, com taxa de mortalidade bruta em torno de 50%. As taxas de mortalidade permanecem cada vez mais altas do que as observadas nos países do Hemisfério Norte, enfatizando a necessidade de melhorar as práticas locais de manejo clínico, incluindo diagnóstico precoce, controle de origem e terapia antimicótica precisa (DOI et al., 2016).

2.2 Farmacoterapia da candidíase invasiva

O tratamento disponível atualmente para infecções sistêmicas por *Candida* inclui os agentes triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, ravuconazol e albaconazol), as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), os polienos (anfotericina B convencional e suas formulações lipídicas) e a flucitosina.

Os agentes triazólicos são fármacos sintéticos com atividade fungistática de amplo espectro de ação, incluindo *Candida* spp., fungos polimórficos e filamentosos. Sua ação se dar pela inibição da enzima fúngica 3A do citocromo P450, a lanosina 14α-desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Com a depleção do ergosterol, principal esterol da membrana celular fúngica, ocorre uma alteração da fluidez da membrana, que por sua vez, interfere na ação das enzimas associadas à membrana, resultando em inibição da replicação fúngica. Além disso, estes fármacos também inibem a transformação das leveduras em hifas, consideradas a forma invasiva e patogênica da *Candida* (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FUCHS; WANNMACHER, 2014; RANG et al., 2016).

As equinocandinas são modificações sintéticas da equinocandina B, encontrada naturalmente no *Aspergillus nidulans*. Possuem atividade fungicida para *Candida* e fungistática contra *Aspergillus* spp.. Seu mecanismo de ação ocorre via inibição da beta-(1,3)-D-glicano sintase, uma enzima imprescindível para síntese da parede celular fúngica, porém, não presente nas células de mamíferos. Com a inibição dessa enzima, ocorre o bloqueio da síntese do 1,3-β-glicano, um polímero de glicose necessário para manutenção da parede celular, sem ele, as células fúngicas perdem a integridade e sofrem lise celular (FUCHS; WANNMACHER, 2014; RANG et al., 2016).

A anfotericina B e suas formulações lipídicas (dispersão coloidal, complexo lipídico e lipossomal) são uma mistura de substâncias antifúngicas derivadas de culturas de *Streptomyces*. Estes fármacos se ligam aos esteróis (principalmente o ergosterol) presentes na membrana da célula fúngica e interfere na permeabilidade e nas funções de transporte através de sua provável capacidade de formar grandes poros transmembrânicos, causando grandes perturbações no equilíbrio iônico, como a perda de íons potássio intracelular, e consequentemente, a lise celular. Tem um amplo espectro de ação, sendo ativa contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e espécies de *Zigomycetos*, mas não inclui fungos causadores de dermatofitoses superficiais (FUCHS; WANNMACHER, 2014; RANG et al., 2016).

E por fim, a flucitosina, um análago fluorinado da citosina. Este fármaco inibe a síntese de DNA do fungo causando uma aberração na sua transcrição. Devido ao seu

significativo grau de resistência, praticamente não é utilizada em monoterapia, sendo associada normalmente com a anfotericina. Seu espectro de ação aborda *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., alguns fungos causadores de cromoblastomicose e algumas cepas de *Sporothrix* e *Aspergillus* (FUCHS; WANNMACHER, 2014).

A resistência de *C. albicans* aos antifúngicos é incomum, no entanto, tem sido relatada com o uso prolongado de antifúngicos ou em infecções recorrentes. Algumas espécies de *Candida* são naturalmente resistentes ao fluconazol, é o caso de *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. fermentati*, enquanto outras, como *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae* desenvolvem resistência adquirida (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; CHENG et al., 2016; LOCKHART et al., 2017; PAPPAS et al., 2018). A resistência intrínseca, também conhecida como natural, é aquela que faz parte das características naturais e fenotípicas do micro-organismo, transmitida apenas verticalmente. Enquanto que a resistência adquirida, caracterizada pelo aparecimento de resistência em uma determinada espécie que anteriormente era sensível, é resultante de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula do micro-organismo, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas (DEL FIO; FILHO; GROPPO, 2000).

No Brasil, Mato Grosso do Sul, um estudo analisou 105 amostras de pacientes adultos diagnosticados com candidúria e identificou que todas as espécies de *Candida* isoladas no estudo eram suscetíveis à voriconazol e à anfotericina B, porém, todos os isolados de *C. krusei* eram resistentes ao fluconazol e os isolados de *C. glabrata* apresentaram sensibilidade dose dependente ou resistência ao fluconazol (LIMA et al., 2017).

A resistência fúngica a múltiplas drogas, até então considerada rara, vem sendo cada vez mais relatada, é o caso de *C. auris*, agente etiológico de uma infecção emergente de alta taxa de mortalidade associadas à assistência médica em todo o mundo. Lockhart e colaboradores (2017) analisaram 54 amostras isoladas de pacientes com infecção por *C. auris* provenientes do Paquistão, Índia, África do Sul, Venezuela e Japão, e identificaram que 93% eram resistentes ao fluconazol, 54% ao voriconazol, 35% à anfotericina B, 7% às equinocandinas e 6% à flucitosina. O mesmo estudo também identificou que ao todo, 41% dos isolados eram resistentes a duas ou mais classes de antifúngicos.

Ao contrário do que está estabelecido para as bactérias, classificadas em resistentes a múltiplas drogas (MDR), extensivamente resistentes a drogas (XDR) e resistentes a pandrogas (PDR) pelos Centros de Prevenção e Controle de Doenças Europeu e dos Estados Unidos, ainda não se tem uma classificação padronizada de resistência para os fungos. Dessa forma, Arendrup e Patterson (2017) propuseram uma definição padrão para *Candida*, denominando

MDR como um isolado resistente a pelo menos um antifúngico de duas ou mais classes de fármacos e XDR como um isolado resistente a pelo menos um antifúngico de três ou mais classes de fármacos.

2.3 Produtos sintéticos

A descoberta de substâncias inovadoras com atividade antimicrobiana é alvejada por inúmeros pesquisadores, pois, devido ao uso indiscriminado dos medicamentos com atividade antimicrobiana na terapêutica, o número de micro-organismos resistentes e/ou multirresistentes aos tratamentos tem aumentado consideravelmente (OLIVEIRA et al., 2014), por conseguinte, provocando aumento da morbimortalidade dos pacientes e amplificação dos custos para o sistema de saúde (DOI et al., 2016).

Diante dessa corrida pela descoberta de novos fármacos antimicrobianos, os produtos naturais e seus derivados, especialmente as plantas, têm sido muito utilizados como fonte de pesquisas devido à grande diversidade de substâncias com atividade biológica (LAHLOU, 2007; NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016). Entretanto, o uso de produtos sintéticos tem crescido consideravelmente nos últimos anos em decorrência da agilidade no processamento e da capacidade de modelagem molecular, tornando-se uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de fármacos com propriedades farmacológicas mais seguras e eficientes (SAMPAIO et al., 2014). Além da síntese, outra ferramenta da química medicinal, também de grande valia, é o planejamento de fármacos, que se destaca pela utilização de diferentes técnicas computacionais que analisam a relação estrutura-atividade (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

Um desses candidatos sintéticos é a substância teste da presente pesquisa, referida quimicamente como 2-bromo-N-fenilacetamida (Figura 2), a qual foi escolhida a partir de uma triagem de atividade antifúngica com outras substâncias sintéticas e naturais. Tal composto foi sintetizado no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) com base em vias sintéticas já publicadas (XIE et al., 2007). Procedimento sintético: em um balão de 50 mL contendo anilina (1,86 g; 0,020 mols) e carbonato de potássio (3,31 g; 0,024 mols), solubilizado em 20 mL de clorofórmio a uma temperatura de 0°C, foi adicionado lentamente o bromo de 2-bromoacetila (4,84 g; 0,024 mols). Depois, foi retirado o banho de gelo e a reação ficou sobre agitação por 20 horas em temperatura ambiente. A mistura reacional foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (hexano/acetato de etila 1:1), que ao seu término, foi submetida a uma extração. A

fase orgânica foi lavada com água (3 x 25 mL), secada no sulfato de sódio anidro e depois concentrada à uma pressão reduzida, fornecendo um precipitado, o qual, foi purificado através da técnica de recristalização em etanol/água, com rendimento de 83%.

A estrutura química da 2-bromo-N-fenilacetamida foi confirmada por espectrômetro FTIR modelo IRPrestige-21, do fabricante Shimadzu, com acessório de reflectância total atenuada, e espectro de RMN ^{1}H obtido no aparelho da Marca Bruker, operando a 400 MHz; ponto de fusão: 130-132 °C.

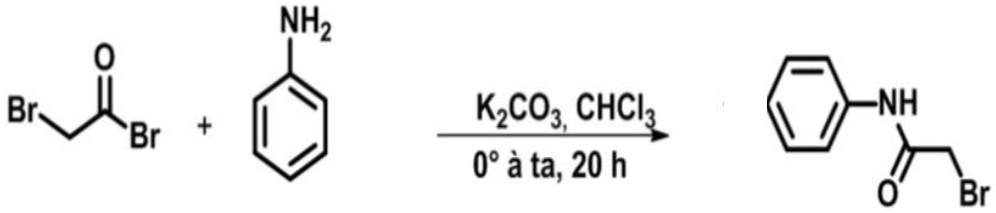

Figura 2: reação de síntese da 2-bromo-N-fenilacetamida.

As infecções causadas pelo gênero *Candida* representam um grande desafio, pois, além de serem responsáveis por cerca de 80% de todas as infecções fúngicas no ambiente hospitalar, promovem hospitalização prolongada, são de difícil diagnóstico e detém altas taxas de prevalência e mortalidade (COLOMBO et al., 2013; COLOMBO et al., 2014). Nesse contexto, o aumento da prevalência das infecções fúngicas, em especial, a candidíase invasiva, aliado ao surgimento crescente de cepas fúngicas resistentes e um arsenal terapêutico limitado para tratar pacientes com infecções graves, sinalizam a necessidade do desenvolvimento de pesquisas pré-clínicas e clínicas com o intuito de acelerar a descoberta de fármacos mais efetivos e seguros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* da substância sintética 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* isoladas de pacientes com candidíase invasiva assistidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), João Pessoa-PB, no ano de 2017.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o agente etiológico e seu perfil de sensibilidade através do *Kit* comercial Candifast®, bem como comparar com a identificação realizada pelo laboratório de micologia clínica da UFPB;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) da 2-bromo-N-fenilacetamida contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com candidíase invasiva assistidos no HULW;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) através do método de associação (*checkerboard*) da substância teste com o antifúngico padrão de escolha.

4. METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

Os ensaios laboratoriais do presente trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Substâncias

A molécula 2-bromo-N-fenilacetamida foi utilizada nos ensaios de atividade biológica e foi escolhida por ter tido melhor atividade após a aplicação de uma triagem realizada com nove substâncias (mirtenol, p-cimeno, mentona, amida 6, amida 15, A7, A8, A14 e 2-bromo-N-fenilacetamida). Tal substância foi sintetizada e fornecida pelos pesquisadores Dr. Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Dr. Rafael Farias de Oliveira e o Prof. Dr. Petrônio Figueiras de Athayde Filho do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica/CCEN/UFPB. O fluconazol foi escolhido como antifúngico padrão e foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

Para a realização dos ensaios, as referidas substâncias foram solubilizadas em Tween 80 a 2% e dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de até 10%, posteriormente,

preparadas nas concentrações de 1024 até 2 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

4.3 Meios de cultura

Para a manutenção das cepas e a realização dos ensaios de atividade antifúngica, foram utilizados, respectivamente, o Agar Sabouraud Dextrose – ASD (Difco Laboratories Ltd, USA, France) e o Roswell Park Memorial Institute – RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (INLAB, São Paulo-SP, Brasil), os quais foram preparados de acordo com as descrições dos fabricantes.

4.4 Isolados clínicos e cepas fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizados dez isolados clínicos de *C. albicans* (117, 516, 587, 616, 699, 700, 800, 807, 814 e 917) e cinco isolados do complexo *C. parapsilosis* (439, 546, 689, 5770 e 55117), bem como cepas de controle de qualidade para ambas as espécies: ATCC 76485 da primeira e ATCC 22019 da segunda. Os isolados clínicos foram provenientes de pacientes com candidíase invasiva assistidos no HULW no ano de 2017, os quais foram isolados, identificados através de técnicas laboratoriais tradicionais (exame microscópico direto, macromorfologia, micromorfologia e provas bioquímicas) no Laboratório de Micologia Clínica da UFPB e armazenados em sua micoteca. Tais isolados foram cedidos para o presente estudo após aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde – UFPB (Parecer de nº 3.218.923).

As cepas padrão e os isolados clínicos foram mantidos à temperatura de 4ºC no Laboratório de Pesquisa, com a finalidade de diminuir a atividade enzimática dos micro-organismos e, consequentemente, seu crescimento. Posteriormente, todas foram repicadas e incubadas a 35 ± 2ºC, por 24-48 horas antecedentes ao início dos ensaios.

4.5 Inóculo

Para preparação do inóculo, as cepas padrão e os isolados clínicos das leveduras foram semeados em meio nutriente e incubadas a 35 ± 2ºC, por 24-48 horas. Logo após, as colônias dessas culturas foram suspensas em solução de NaCl 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o padrão do tubo nº 0,5 da escala McFarland, para obter um inóculo de aproximadamente 10^6

UFC)/mL. Em seguida, essa suspensão foi diluída com água destilada numa proporção de 1:10 resultando em um inóculo contendo aproximadamente 10^5UFC/mL, o qual foi utilizado nos ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HOLETZ et al., 2002).

4.6 Identificação e perfil de sensibilidade das leveduras através do Candifast®

O Candifast® é um *kit* comercial fabricado pela empresa francesa *International Microbio* que permite a identificação de espécies de *Candida* e a realização de testes de sensibilidade, indicando se é sensível ou resistente. Cada teste constitui-se em uma bandeja com duas fileiras de dez pocinhos, a primeira fileira para identificação, a qual se baseia na susceptibilidade da levedura à actidiona e na fermentação de sete açucares (glicose, galactose, trealose, maltose, celobiose, rafinose e lactose), e a segunda fileira para o teste de resistência, o qual se baseia no crescimento ou não da levedura frente aos seguintes antifúngicos: anfotericina B (4 µg/mL), nistatina (200 UI/mL), 5-flucitosina (35 µg/mL), econazol (16 µg/mL), cetoconazol (16 µg/mL), miconazol (16 µg/mL) e fluconazol (16 µg/mL).

Cada amostra foi inoculada em sua respectiva bandeja, logo depois, foi coberta com uma película plástica para evitar ressecamento e colocada em estufa por 35 ± 2ºC por 24-48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras dos resultados de acordo com o protocolo preconizado pelo *kit*, o qual se baseia na mudança de coloração do meio.

4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM da 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, em triplicata, por meio de placas de 96 poços estéreis (INLAB/Indústria Brasileira), com cavidade em formato de "U", conforme os protocolos de Cleeland e Squires (1991), CLSI (2008) e Hadacek e Greger (2000). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL do meio RPMI 1640 nos poços das placas, posteriormente, 100 µL da emulsão duplamente concentrada da 2-bromo-N-fenilacetamida foram diluídos em série no meio de cultura a uma razão de dois, de modo a obter concentrações de 1024 µg/mL até 2 µg/mL da substância teste da seguinte forma: na primeira linha de cada coluna da placa se encontrará a maior concentração do composto e na última linha a menor. Por fim, foram adicionados 10 µL dos inóculos das espécies de *Candida* nas cavidades, de maneira que cada coluna da placa correspondesse a um isolado específico.

Paralelamente, foi utilizado como controle de esterilidade o meio RPMI e como controle de viabilidade das leveduras ensaiadas o RPMI 1640 mais inóculo.

As placas assepticamente fechadas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24-48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras dos resultados. A CIM foi definida como a menor concentração da substância testada capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas. A atividade antifúngica da 2-bromo-N-fenilacetamida foi interpretada e considerada como ativa ou inativa com base nos seguintes critérios: forte/ótima atividade para valores de CIM abaixo de 500 μg/mL; atividade moderada para valores de CIM entre 600 e 1500 μg/mL; e atividade fraca ou produto inativo para valores de CIM acima de 1500 μg/mL (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; SARTORATTO et al., 2004).

4.8 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 μL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram adicionadas a 100 μL de caldo RPMI contidos em novas placas de microdiluição/96 poços e incubadas por 24-48 horas a 35 ± 2°C. A CFM foi considerada como sendo a menor concentração do produto teste capaz de inibir o crescimento das leveduras. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCUBE, AFOLAYAN, OKOH, 2008; SALIE; EAGLES; LENG, 1996). Paralelamente, foi utilizado como controle de esterilidade o meio RPMI e como controle de viabilidade das leveduras ensaiadas o RPMI 1640 mais inóculo.

Também foi avaliado o modo de ação da substância teste através da razão CFM/CIM, metodologia esta utilizada por Hafidh e colaboradores (2011) para especificar a natureza do efeito antimicrobiano, considerada como fungicida quando a razão CFM/CIM está entre 1:1 a 2:1, por outro lado, se a proporção for maior que 2:1, o modo de ação tem maior probabilidade de ser fungistático.

4.9 Ensaio de associação através do método *checkerboard*

O efeito da associação da 2-bromo-N-fenilacetamida com o antifúngico de escolha (fluconazol) foi determinado através da técnica de *checkerboard* para derivação do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). Para realização desse ensaio, 100 μL do meio

RPMI 1640 foram distribuídos nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades, com fundo em forma de "U" (INLAB, São Paulo-SP, Brasil). Posteriormente, 50 µL da substância teste em diversas concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8) foram adicionados no sentido vertical e 50 µL do antifúngico de escolha, também em diferentes concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8), foram adicionados no sentido horizontal da microplaca. Por último, foram acrescentados 20 µL da suspensão fúngica, previamente ajustados de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2ºC e após 24-48 horas foi feita a leitura para observar a presença ou não do crescimento fúngico visível (WHITE et al., 1996). Paralelamente, foi utilizado como controle de esterilidade o meio RPMI e como controle de viabilidade das leveduras ensaiadas o RPMI 1640 mais inóculo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A concentração inibitória fracionada (CIF) foi calculada para cada produto utilizado na associação, onde CIF_A = CIM do produto A na combinação ÷ CIM do produto A individual e CIF_B = CIM do produto B na combinação ÷ CIM do produto B individual. Posteriormente, o ICIF foi calculado através da soma do CIF_A (substância teste) + CIF_B (antifúngico escolhido). O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (ICIF $\leq$ 0,5); aditividade (ICIF > 0,5 e < 1); indiferença (ICIF $\geq$ 1 e < 4); ou antagonismo (ICIF $\geq$ 4,0) (CORREA-ROYERO et al., 2010; LEWIS et al., 2002).

4.10 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, no caso do método *checkerboard* em duplicata, com experimentos independentes e resultados expressos com estatística descritiva inferencial, utilizando o programa Microsoft Office Excel® (versão 2010), que também foi usado para montagem do banco de dados e registro das informações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2017, foram diagnosticados 25 casos de candidíase sistêmica no Hospital Universitário Lauro Wanderley, provenientes das seguintes unidades de internação: sete (07) casos da Unidade de Terapia Intensiva Adulta, três (03) casos da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica, quatro (04) casos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, seis (06)

casos da Clínica Médica, três (03) casos da Pediatria, um (01) caso do Serviço de Pronto Atendimento e um (01) caso da Unidade de Cirurgia (Figura 3).

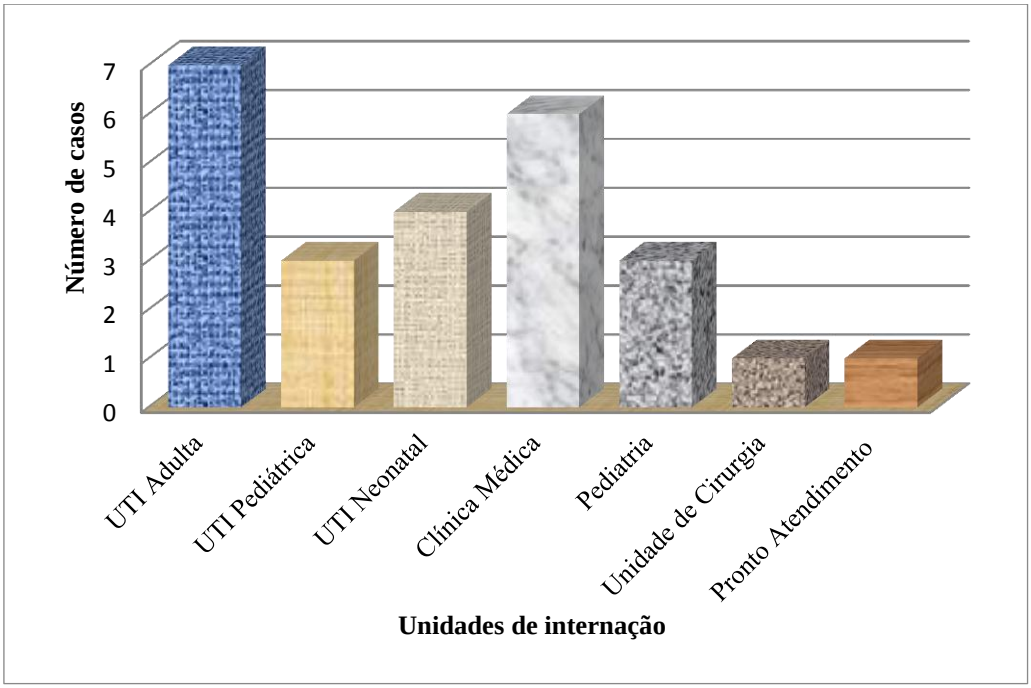

Figura 3 - Frequência comparativa dos casos de candidíase sistêmica diagnosticados nas diferentes unidade de internação do HULW no ano de 2017.

Observou-se que 56% dos casos de candidíase sistêmica ocorreram nos pacientes assistidos no Centro de Terapia Intensiva do hospital universitário. Corroborando com a presente pesquisa, a literatura relata que a candidíase sistêmica é comum entre as infeções graves, especialmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (BABADY, 2016; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). No estudo feito por Navarini (2006), com 82 espécies de *Candida* spp. nativas do Hospital da Santa Casa de São Paulo, identificou que 42% dos casos foram provenientes das Unidades de Terapia Intensiva e Semi-intensiva.

As amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial foram provenientes de hemoculturas (20 casos), ponta de cateter (01 caso) e o restante não teve o registro localizado. Tais amostras foram processadas, isoladas e identificadas no Laboratório de Micologia Clínica da UFPB como sendo *C. albicans* (13 casos), complexo *C. parapsilosis* (07 casos), *C. tropicalis* (04 casos) e *C. guilllermondii* (01 caso). A presente pesquisa identificou *C. albicans* como patógeno mais comum (52%), resultado um pouco superior ao de outro estudo brasileiro desenvolvido por Doria e colaboradores (2015), o qual identificou uma prevalência de 50% de *C. albicans* em ponta de cateter e hemoculturas.

Grandes estudos também têm demonstrado que *C. albicans* ainda é o principal patógeno responsável pela candidíase, é o caso do estudo de vigilância global denominado ARTEMIS, realizado em 41 países com mais de 250.000 espécies de *Candida*, sendo 65,3% identificadas como *C. albicans* (PFALLER et al., 2010), e do estudo multicêntrico realizado em Taiwan com 1.426 amostras de *Candida* isoladas de hemoculturas, das quais, 57,2% foram identificadas como *C. albicans* (HII et al., 2019).

Entretanto, estudos maiores têm mostrado que no Brasil tem ocorrido uma maior frequência de *Candida* não-*albicans*. Navarini (2006) detectou uma frequência de 62% de espécies não-*albicans* de 39 isolados clínicos do Hospital da Santa Casa de São Paulo, Demito e colaboradores (2012) identificaram 58,2% entre 91 isolados clínicos provenientes do Hospital Universitário de Maringá, Braga e colaboradores (2018) observaram uma frequência de 62,1% entre 331 episódios de candidemia provenientes do Hospital Universitário do Rio de Janeiro e Doi et al. (2016) realizaram um estudo em hospitais das cinco regiões brasileiras e constataram uma frequência de 65,7%.

Tanto na revisão de Ben-Ami (2018) quanto no estudo de PAPPAS et al. (2018), *C. albicans* ainda é o agente etiológico mais comum da candidíase invasiva, no entanto, os casos provocados por espécies não-*albicans* tem crescido em uma proporção importante, especialmente, *C. glabrata* que se tornou um importante patógeno na América do Norte, Europa (com exceção da Espanha) e Austrália, enquanto que o complexo *C. parapsilosis* é a espécie dominante na América do Sul, Japão e Espanha.

Dos 25 isolados clínicos, 10 isolados de *C. albicans* e 05 isolados do complexo *C. parapsilosis* foram escolhidos como os mais viáveis para dar seguimento ao presente estudo, juntamente com uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 76485) e uma cepa padrão do complexo *C. parapsilosis* (ATCC 22019), foram submetidas ao teste de identificação pelo método comercial Candifast® (Figura 4).

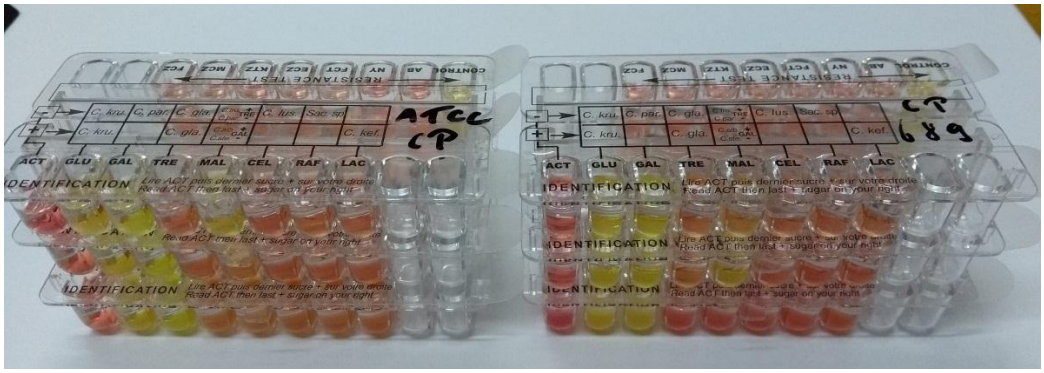

Figura 4: fotografia exibindo as análises do *Kit* Candifast®.

A metodologia de identificação do *Kit* comercial Candifast®, quando comparada com as identificações realizadas pelo Laboratório de Micologia Clínica da UFPB, identificou corretamente os quinze isolados clínicos e a ATCC 22019, no entanto, a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 76486) não foi identificada de forma correta pelo *Kit* (Tabela 1). Dessa forma, a identificação semiautomática do *Kit* Candifast® obteve um percentual de concordância de 94,2% quando comparada com a identificação realizada pelo laboratório supracitado. Navarini (2007) também obteve um bom resultado quando comparou a identificação de leveduras do gênero *Candida* através de duas metodologias comerciais diferentes, Candifast® e CHROMagar®, e identificou uma taxa de concordância de 86,6%, já Doria e colaboradores (2015) não obtiveram sucesso com a aplicação da primeira metodologia, pois, 86% das leveduras não foram identificadas.

Tabela 1 – Identificação das leveduras utilizando o método comercial Candifast® versus a identificação feita por métodos laboratoriais tradicionais (Laboratório de Micologia - UFPB).

Leveduras	**Isolados**	**Identificação das leveduras**	
		Candifast®	Laboratório de Micologia (UFPB)
C. albicans	ATCC 76486	*C. parapsilosis*	* *C. albicans*
	117	*C. albicans*	*C. albicans*
	516	*C. albicans*	*C. albicans*
	587	*C. albicans*	*C. albicans*
	616	*C. albicans*	*C. albicans*
	699	*C. albicans*	*C. albicans*
	700	*C. albicans*	*C. albicans*
	800	*C. albicans*	*C. albicans*
	807	*C. albicans*	*C. albicans*
	814	*C. albicans*	*C. albicans*
	917	*C. albicans*	*C. albicans*
** *C. parapsilosis*	ATCC 22019	*C. parapsilosis*	* *C. parapsilosis*
	439	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
	546	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
	689	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
	5770	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
	55117	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*

* Cepas não identificadas pelo laboratório de micologia da UFPB
** *C. parapsilosis* = complexo *C. parapsilosis*

Paralelamente à identificação, também foi realizado através do *Kit* Candifast®, a análise de resistência dos 15 isolados clínicos e das 02 cepas ATCC, dos quais, 100% foram sensíveis a todos os antifúngicos, exceto para o fluconazol, que teve uma resistência de 41,2%, conforme podemos observar na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos e das cepas ATCC aos antifúngicos do *kit* Candifast® (International Microbio, França).

Leveduras	**Isolados**	**Antifúngicos**						
		Anfo	Nist	Fct	Econ	Ceto	Mico	Fluco
C. albicans	ATCC 76486	S	S	S	S	S	S	S
	117	S	S	S	S	S	S	S
	516	S	S	S	S	S	S	**R**
	587	S	S	S	S	S	S	**R**
	616	S	S	S	S	S	S	**R**
	699	S	S	S	S	S	S	S
	700	S	S	S	S	S	S	**R**
	800	S	S	S	S	S	S	S
	807	S	S	S	S	S	S	S
	814	S	S	S	S	S	S	**R**
	917	S	S	S	S	S	S	**R**
complexo *C. parapsilosis*	ATCC 22019	S	S	S	S	S	S	S
	439	S	S	S	S	S	S	**R**
	546	S	S	S	S	S	S	S
	689	S	S	S	S	S	S	S
	5770	S	S	S	S	S	S	S
	55117	S	S	S	S	S	S	S
	% de S	100	100	100	100	100	100	**58,8**
	% de R	0	0	0	0	0	0	**41,2**

Legenda: S = sensível; R = resistente; Anfo = anfotericina B; Nist = nistatina; Fct = flucitosina; Ceto = cetoconazol; Mico = miconazol; Fluco = fluconazol.

Considerando apenas os isolados clínicos do HULW, bem como os antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase sistêmica, o presente estudo revelou que 100% dos isolados foram sensíveis a anfotericina B e 47% foram resistentes ao fluconazol, sendo 06 isolados clínicos de *C. albicans* (60%) e 01 isolado do complexo *C. parapsilosis* (20%). Moreira e colaboradores (2017) utilizaram a mesma metodologia e identificaram que entre 18 amostras de candidúria provenientes do Hospital Pio XII, São José dos Campos/SP, 88,89% foram resistentes ao fluconazol e 50% à anfotericina B.

Navarini (2007) também realizou um estudo comparativo do perfil de sensibilidade de 81 isolados de *Candida* spp. (40 *C. albicans*, 17 *C. tropicallis*, 02 *C. krusei* e 22 complexo *C. parapsilosis*) utilizando métodos comerciais e identificou uma taxa de concordância, entre Etest® (AB Biodisk, Suécia) e Candifast® (International Microbio, França), de 94% para anfotericina B e 73% para fluconazol, isto é, o primeiro identificou 02 isolados resistentes à anfotericina B e 04 isolados resistentes ao fluconazol, já o segundo identificou 03 isolados resistentes à anfotericina B e 21 isolados resistentes ao fluconazol.

Embora o Candifast® seja um método comercial utilizado na clínica, o mesmo possui um número restrito de antifúngicos para serem testados (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003), além disso, não contempla antifúngicos de grande importância para a farmacoterapia da candidíase sistêmica e outras infecções fúngicas graves, é o caso do voriconazol e as equinocandinas (COLOMBO et al., 2013).

Segundo as diretrizes brasileiras para o tratamento da candidíase, *C. albicans* é naturalmente sensível a todos os antifúngicos sistêmicos, mas casos de resistência adquirida aos fármacos da classe dos azóis têm sido relatados em pacientes que têm exposição prolongada a esses medicamentos. No caso da frequente resistência ao fluconazol, pode ser explicado pelo fato de ser o principal fármaco azólico utilizado na rede do Sistema Único de Saúde (SUS), seja na profilaxia ou no tratamento da candidíase, pois possui uma ampla eficácia contra infecções superficiais e profundas, apresenta um excelente perfil de segurança, boa absorção no trato gastrintestinal e distribuição em diferentes compartimentos corporais, incluindo o sistema nervoso central e os olhos (BEN-AMI, 2018; COLOMBO et al., 2014; KRIENGKAUYKIAT; ITO; DADWAL, 2011). No caso da anfotericina B, a resistência primária é incomum e a resistência adquirida também é rara, a qual envolve a redução da biossíntese de ergosterol e a produção de esteróis alternativos aos quais a anfotericina B possui baixa afinidade (BEN-AMI, 2018).

As peculiaridades epidemiológicas e terapêuticas apresentadas pelas diferentes espécies do gênero *Candida* justificam a necessidade de identificar a levedura ao nível da espécie quando esses micro-organismos estão associados a doenças sistêmicas, pois, este procedimento é de fundamental importância para a escolha da melhor abordagem terapêutica. Nesse contexto, o suporte do diagnóstico micológico é essencial para a prevenção, controle e tratamento das infecções por *Candida*, daí a importância de conhecer a ampla gama de sistemas comerciais manuais e automatizados disponíveis no mercado que permitem a identificação rápida e precisa de leveduras de interesse clínico (COLOMBO et al., 2013; PERLROTH; CHOI; SPERLLBERG, 2007).

Os resultados dos ensaios de avaliação de atividade antifúngica da substância teste contra os isolados clínicos e cepas padrão de *Candida* estão expressos na tabela 3. Analisando os resultados, constatou-se que o valor da CIM_{50} foi de 8 µg/mL para *C. albicans* e 16 µg/mL para complexo *C. parapsilosis*, demonstrando forte atividade. Já a CFM_{50}, teve um valor de 16 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente. O controle de viabilidade das leveduras foi positivo, assegurando o crescimento destas durante a aplicação dos testes. Também não houve crescimento de micro-organismo no controle de esterilidade do meio RPMI.

Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas e Concentrações Fungicidas Mínimas da 2-bromo-N-fenilacetamida sobre os isolados clínicos e cepas de *C. albicans* e complexo *C. parapsilosis*.

Leveduras	**Isolados**	**2-bromo-N-finilacetamida**	
		CIM (µg/mL)	**CFM (µg/mL)**
C. albicans	ATCC 76486	8	16
	117	8	8
	516	8	16
	587	8	16
	616	4	16
	699	4	8
	700	16	16
	800	16	64
	807	16	64
	814	8	16
	917	8	16
complexo *C. parapsilosis*	ATCC 22019	32	32
	439	32	32
	546	32	32
	689	16	32
	5770	16	64
	55117	16	32

As infecções fúngicas, especialmente as sistêmicas, como a candidíase invasiva, além de requerer um tratamento complexo, possuem um arsenal farmacoterapêutico discreto, limitando-se a três classes de medicamentos que se sumarizam nos seguintes fármacos: fluconazol, voriconazol, anfotericina B, anidulafungina, caspofungina, micafungina e em casos pontuais a flucitosina, uma pirimidina que atua como adjuvante no tratamento da

candidíase do sistema nervoso central e endocardite por *Candida* (BEN-AMI, 2018; NEGRI et al., 2014).

Atualmente, alguns compostos inovadores com atividade anti-*Candida* estão em vários estágios de pesquisa (BEN-AMI, 2018), no entanto, esse avanço pode ser considerado tímido diante da contínua e crescente prevalência das infecções fúngicas e de sua resistência aos tratamentos atuais, sobretudo pela disseminação de patógenos multidrogas resistentes, os quais aumentam ainda mais a necessidade de medicamentos novos, baratos, eficazes e seguros (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; HII et al., 2019; JOSÉ et al., 2019). Uma das fontes de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos são os produtos naturais, sobretudo as plantas medicinais (HAFIDH et al., 2011). Outra fonte importantíssima são as ferramentas da química medicinal, dentre elas, a síntese e o planejamento de fármacos. Este último destaca-se pela utilização de diferentes técnicas computacionais que analisam a relação estrutura-atividade (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

A síntese de substâncias puras tornou-se uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades farmacológicas aprimoradas e, atualmente, o uso de modelagem molecular contribui de maneira significante para a descoberta de novos medicamentos, mais seguros e eficientes (SAMPAIO et al., 2014).

Um agente antifúngico pode ter atividade fungicida ou fungistático. Tal conhecimento é de suma importância, pois, nos casos de imunossupressão associado à infecção, o tratamento com fármacos fungicida é mais indicado por ser mais efetivo. Conforme Hafidh et al. (2011), uma forma de analisar se uma substância tem atividade fungicida ou fungistática é através do cálculo da razão entre CFM e CIM, a qual, considera como fungicida quando a razão está entre 1:1 a 2:1, e fungistático se a proporção for maior que 2:1. Diante dessa premissa, os testes revelaram que a 2-bromo-N-fenilacetamida apresentou atividade fungicida tanto para *C. albicans* quanto para complexo *C. parapsilosis*, uma vez que, para ambas as espécies, o resultado da razão foi de 2:1. Tais resultados também estão alinhados quando aplicado a metodologia citada por Siddiqui e seus colegas (2013). Portanto, a 2-bromo-N-fenilacetamida pode ser considerada como uma substância sintética com grande potencial para ser utilizada, no mínimo, como uma fonte para novos antimicrobianos ou até mesmo como candidata a fármaco com boa atividade anti-*Candida*.

Siddiqui e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de dois novos derivados de halopirazol contra bactérias e fungos, dentre eles, *C. albicans*, e obtiveram a CIM variando de 12,5 a 50 µg/mL e uma relação CFM/CIM de 2, enquanto que a presente pesquisa obteve resultados melhores, com a CIM variando de 4 a 16 µg/mL e uma relação

CFM/CIM de 2. Elgemeie e colaboradores (2017), também utilizaram a técnica de microdiluição e testaram o efeito antifúngico de sete compostos sintetizados contra isolado de *C. albicans*, no entanto, os ensaios identificaram resultados pouco promissores, pois, foram bastante superiores aos supracitados, com CIM de 1000 µg/mL para seis (06) compostos e CIM de 4000 µg/mL para um (01) composto.

Vários estudos também avaliaram a atividade de compostos sintéticos contra isolados clínicos de *C. albicans* e obtiveram bons resultados. Gouveia et al. (2009) sintetizaram catorze (14) derivados de 5-arilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-onas, testaram e identificaram CIM na faixa de 8 a 64 µg/mL, Bharti et al. (2010) reportou que oito (08) novas bases de Schiff exibiram valor de CIM na faixa de 6,25 a 25 µg/mL, Chimenti et al. (2011) constataram que vinte e oito (28) derivados de novos tiazóis apresentaram valor de CIM na faixa de 0,125 a 64 µg/mL, Silva (2012) testou a atividade de quatro (04) novos derivados 4-tioxo-tiazolidin-2-ona e identificou CIM's de 4 µg/mL e de 16 µg/mL. Contudo, nenhum desses estudos avaliou a atividade contra isolados do complexo *C. parapsilosis*, para os quais a presente pesquisa também obteve um resultado muito bom, com CIM_{50} de 16 µg/mL.

Nos ensaios para avaliar o efeito da associação do produto teste 2-bromo-N-fenilacetamida com o fluconazol, este escolhido como fármaco padrão devido ao perfil de resistência apresentado pelas leveduras já discutido anteriormente, foi detectado que o perfil da interação para todos os isolados, independentemente da concentração empregada nos dois compostos, foi do tipo indiferente. (Tabela 4).

Tabela 4: Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre 2-bromo-N-fenilacetamida e fluconazol sobre os isolados clínicos de *C. albicans* e complexo *C. parapsilosis*.

	CIFA	**CIFB**	**ICIF**	**Tipo de interação**
Isolados clínicos	**2-bromo-N-fenilacetamida**	**Fluconazol**		
Ca 516	1	0,25	1,250	Indiferente
Ca 587	1	0,002	1,002	Indiferente
Ca 616	2	0,062	2,062	Indiferente
Ca 700	1	0,062	1,062	Indiferente
Ca 814	1	0,062	1,062	Indiferente
Ca 917	1	0,062	1,062	Indiferente
Cp 439	1	0,062	1,062	Indiferente

Legenda: Ca = *C. albicans*; Cp = complexo *C. parapsilosis*

As interações medicamentosas podem ser do tipo sinérgica, antagônica ou indiferente. No primeiro caso, existe a associação de dois ou mais fármacos, cuja resultante intensifica ou potencializa o efeito um do outro, isto é, o efeito final será maior do que a simples soma dos seus efeitos isolados. Tal resposta pode provocar aumento da eficácia, redução da toxicidade, diminuição dos efeitos adversos, menor dose terapêutica e redução do avanço da resistência microbiana. No antagonismo, a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença de outro, através de vários mecanismos, dentre eles, mecanismos químicos e farmacocinéticos, podendo resultar em uma resposta benéfica (quando funciona como antídoto) ou maléfica (quando reduz ou suprime a resposta terapêutica). Por fim, a indiferença farmacológica, a qual ocorre quando o mecanismo de ação de um não interfere no mecanismo de ação do outro (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; OLIVEIRA, 1986; VAN VUUREN; VILJOEN, 2011). Nessa perspectiva, embora o presente estudo seja de pequeno porte, a 2-bromo-N-fenilacetamida não exibiu antagonismo frente ao fluconazol, o qual, sob o contexto da resposta farmacológica maléfica, seria indesejável. Além disso, como os testes de associação foram executados com leveduras resistentes ao fluconazol, também é possível conjecturar que a associação entre a substância teste e o fluconazol não conseguiu reverter o processo de resistência.

Os resultados *in vitro* desta pesquisa sobre a atividade anti-*Candida* da 2-bromo-N-fenilacetamida são notórios e dão sustentação para que outros estudos *in vitro* sejam realizados, os quais subsidiarão, a depender dos resultados, a aplicação de estudos *in vivo*. Ademais, também servem como base para investigar atividade contra outros micro-organismos, bem como aplicação de estudos de planejamento molecular visando à concepção de agentes antimicrobianos mais efetivos e menos tóxicos.

A inserção de novos medicamentos antimicrobianos mais seguros e eficientes é de grande valia, no entando, não podemos perder de vista que o aperfeiçoamento das técnicas de diagnósticos, a aplicação de práticas multi e interdisciplinares direcionadas para reduzir a incidência de infecções microbianas, também serão vitais para reduzir a morbidade e a mortalidade dos pacientes.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou que em 2017, a maioria dos casos de candidíase invasiva foi proveniente de pacientes internos nas unidades de terapia intensiva do Hospital Universitário Lauro Wanderley, tendo a espécie *C. albicans* como agente etiológico mais comum. Também

alerta para a alta taxa de resistência identificada ao fluconazol na amostra estudada, a qual se faz necessário à confirmação através de metodologias de referência, como diluição em caldo, para que seja planejado estratégias clínicas que subsidiem as decisões por uma terapêutica mais racional.

Além disso, embora o *Kit* comercial Candifast® tenha tido neste estudo bons resultados na identificação de isolados clínicos de *C. albicans* e do complexo *C. parapsilosis*, o mesmo não identificou corretamente a cepa padrão ATCC 76486 de *C. albicans*, assim sendo, é preciso que estudos mais robustos confirmem a sua viabilidade como método semiautomático na rotina laboratorial, pois, além do seu alto custo, o mesmo não possui antifúngicos importantes como o voriconazol e as equinocandinas nos testes de sensibilidade.

Por fim, no que diz respeito à atividade biológica, este foi o primeiro estudo com a substância sintética 2-bromo-N-fenilacetamida, a qual apresentou forte atividade fungicida contra isolados clínicos de *C. albicans* e do complexo *C. parapsilosis* oriundos de pacientes com candidíase invasiva. Em complemento, a associação dessa substância sintética com o fluconazol se mostrou indiferente, independentemente da concentração utilizada.

REFERÊNCIAS

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and Treatment. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 216, p. 445-451, 2017.

ARROIO, A.; HONORIO, K. M.; SILVA, A. B. F. Propriedades Químico-Quânticas Empregadas em Estudos das Relações Estrutura-Atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.

BABADY, N. E. Hospital-associated infections. **Microbiology spectrum**, Washington, v. 4, n. 3, p. 21-22, 2016.

BALOURI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of pharmaceutical analysis**, Xi'an, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BEN-AMI, R. Treatment of invasive candidiasis: a narrative review. **Journal of fungi**, Basel, v. 4, n. 3, p. 1-18, 2018.

BHARTI, S. K.; NATH, G.; TILAK, R.; SINGH, S. K. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 2, p. 651-660, 2010.

BRAGA, P. R.; CRUZ, I. L.; ORTIZ, I.; BARREIROS, G.; NOUÉR, S. A.; NUCCI, M. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **The Brazilian journal of infectious diseases**, Salvador, v. 22, n. 4, p. 273-277, 2018.

BRASIL. ABNT. Associação brasileira de normas técnicas. ABNT NBR 6023:2018.

BRASIL. ABNT. Associação brasileira de normas técnicas. ABNT NBR 10520:2002.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, A. B.; KNOLLMANN, C. B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CHENG, J. W.; YU, S. Y.; XIAO, M.; WANG, H.; KUDINHA, T.; KONG, F.; XU, Y, C. Identification and antifungal susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* from a multicenter study in China. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 54, n. 8, p. 2187–2199, 2016.

CHIMENTI, F.; BIZZARRI, B.; BOLASCO, A.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; GRANESE, A.; CARRADORI, S.; D'ASCENZIO, M.; LILLI, D.; RIVANERA, D. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazoles as anti-Candida spp. Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 46, n. 1, p. 378-382, 2011.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. New York: Wiliams & Wilkins, 1991.

CLSI. **Reference method for broth diluition antigungal susceptibility testing of yeasts**. CLSI document M27-A3, 2008; 28(14);10.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANNC, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A. S.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian journal of infectious diseases**, São Paulo, v. 17, n.3, p. 283-312, 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T.; PASQUALOTTO, A. C.; ANDREOTTI, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; NOUÉR, S. A.; NUCCI, M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive care medicine**, New York, v. 40, n. 10, p. 1489–98, 2014.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

DEL FIO, F. S.; FILHO, T. R. M.; GROPPO, F. C. Resistência bacteriana. **Revista brasileira de medicina**, Rio de Janeiro**,** v. 57, n. 10, p. 1129-1140, 2000.

DEMITTO, F. O.; DO AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. in vitro among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. **Jornal Brasilero de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 5, p. 315-322, 2012.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 1, 2016.

DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B.; FIGUEIRA, F. R.; SORGE, C. P. C.; BERNARDES, R. C.; BATISTA, A. C. S.; KHOURI, S. Estudo comparativo de hemoculturas e cateteres positivos para leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. **Revista Univap**, São Paulo, v. 21, n. 38, p. 47-55, 2015.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet. Infectious diseases**, New York, v. 3, n. 11, p. 685–702, 2003.

ELGEMEIE, G.; ALTALBAWY, F.; ALFAIDI, M.; AZAB, R.; HASSAN, A. Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of novel 5-benzoyl-*N*-substituted amino- and 5-benzoyl-*N*-sulfonylamino-4-alkylsulfanyl-2-pyridones. **Drug design, development and therapy**, Auckland, v. 11, p. 3389-3399, 2017.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica:** fundamentos da terapêutica racional. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal brasileiro de patologia e medicinal laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOUVEIA, F. L.; DE OLIVEIRA, R. M.; DE OLIVEIRA, T. B.; DA SILVA, I. M.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE SENA, K. X. F. R.; DE ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris,, v. 44, n. 5, p. 2038–2043, 2009.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R.; ABDULAMIR, A. S.; VERN, L.; BAKAR, F. A.; ABAS, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The open microbiology journal**, Sharjah, v. 5, p. 96-106, 2011.

HII, I. M; LIU, C. E.; LEE, Y. L.; LIU, W. L.; WU, P. F.; HSIEH, M. H.; HO, M. W.; CHEN, Y. H.; WANG, F. D. Resistance rates of non-*albicans Candida* infections in Taiwan after the revision of 2012 clinical and laboratory standards Institute breakpoints. **Infection and Drug Resistance**, Auckland, v. 12, p. 235-240, 2019.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essencial oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, n. 6, p. 428-433, 2003.

HOOG, G. G. J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. **Atlas of Clinic fungi**. Virgili: Central bureau voor shimmel cultures, 2011.

IWUAFOR, A. A.; OGUNSOLA, F. T.; OLADELE, R. O.; ODUYEBO, O. O.; DESALU, I.; EGWUATU, C. C.; NNACHI, A. U.; AKUJOBI, C. N.; ITA, O. I.; OGBAN, G. I. Incidence, clinical outcome and risk factors of intensive care unit infections in the Lagos University Teaching Hospital (LUTH), Lagos, Nigeria. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1-15 2016.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. **Microbiologia médica**. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

JOSÉ, P.; ALVAREZ-LERMA, F.; MASEDA, E.; OLAECHEA, P.; PEMÁN, J.; SORIANO, C.; ZARAGOZA, R. Invasive fungal infection in crtically ill patients: hurdles and next challenges. **Journal of chemotherapy**, Firenze, v. 31, n. 2, p. 64-73, 2019.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clinical epidemiology**, Auckland, v. 3, n. 1, p. 175-191, 2011.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.

LAHLOU, M. Screening of natural products for drug discovery. Expert opinion on drug discovery, London, v. 2, n. 5, p. 697-705, 2007.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSER, M. E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 49, n. 2, p. 345-351, 2002.

LIMA, G. M. E.; NUNES, M. O.; CHANG, M. R.; TSUJISAKI, R. A. S.; NUNES, J. O.; TAIRA, C. L.; THOMAZ, D. Y.; NEGRO, G. M. B. D.; MENDES, R. P.; PANIAGO, A. M. M. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, n. 75, p. 1-8, 2017.

LOCKHART, S. R.; ETIENNE, K. A.; VALLABHANENI, S.; FAROOQI, J.; CHOWDHARY, A.; GOVENDER, N. P.; COLOMBO, A. L.; CALVO, B.; CUOMO, C. A.; DESJARDINS, C. A.; BERKOW, E. L.; CASTANHEIRA, M.; MAGOBO, R. E.; JABEEN, K.; ASGHAR, R. J.; MEIS, J. F.; JACKSON, B.; CHILLER, T.; LITVINTSEVA, A.P. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 64, n. 2, p. 134–140, 2017.

MOREIRA, L. S.; DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B.; FIGUEIRA, F. R.; SORGE, C. P. C., SILVA, A. M.; KHOURI, S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. **Revista Univap**, São Paulo, v. 23, n. 43, p. 44-52, 2017.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J.; TÍNEL, L. O.; SILVA, E. S.; RODRIGUES, L. A.; FREITAS, T. O. N.; NUNES, X. P.; AMORIM, E. L. C. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 57-66, 2016.

NAVARINI, Alessandra. **Avaliação de testes de identificação e sensibilidade que podem ser utilizados em laboratórios clínicos em cepas de *Candida* spp..** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2006.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

NEGRI, M.; SALCI, T. P.; SHINOBU-MESQUITA, C. S.; CAPOCI, I. R.; SVIDZINSKI, T. I.; KIOSHIMA, E. S. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 3, p. 2925-2956, 2014.

OLIVEIRA, D. S. Interação Medicamentosa: parte II. **Caderno de Farmácia**, Rio Grande do Sul, v. 2, n. 2, p. 97-110, 1986.

OLIVEIRA, T. M.; CARVALHO, R. B. F.; FREITAS, R. M.; LIMA, S. G. Um possível mecanismo de ação para o efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, Araraquara, v. 35, n. 1, p. 67-74, 2014.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature reviews. Disease primers**, London, v. 11, n. 4, p. 1-20, 2018.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPERLLBERG, B. Nosocomial fungal infection: epidemiology, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 321-346, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1366-1377, 2010.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale:** farmacologia. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SALIE, F.; EAGLES, P. F. K.; LENG, H. M. J. Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 52, n. 1, p. 27–33, 1996.

SAMPAIO, G. M. M.; TEIXEIRA, A. M. R.; COUTINHO, H. D. M.; SENA JUNIOR, D. M.; FREIRE, P. T. C.; BENTO, R. R. F.; SILVA, L. E. Synthesis and antibacterial activity of a new derivative of the meldrun acid: 2,2-dimethyl-5-(4H–1,2,4-triazole-4-ylaminomethylene)-1,3-dioxane-4,6-dione ($C_9H_{10}N_4O_4$). **EXCLI Journal**, Dortmund, v. 13, p. 1022-1028, 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia:** mecanismos das doenças infecciosas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, N.; MUSTHAFA, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riad, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, Ivanildo Mangueira da. Síntese e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de derivados tiazolidínicos e triazólicos. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 1023-1052, 2016.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies--methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta medica**, Stuttgart, v. 77, n. 11, p. 1168-182, 2011.

WHEELER, M. L.; LIMON, J. J.; UNDERHILL, D. M. Immunity to commensal fungi: detente and disease. **Annual review of pathology**, Califórnia, v. 12, p. 359-385, 2017.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDRURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

XIE, H; NG, D.; SAVINOV, S. N.; DEY, B.; KWONG, P. D.; WYATT, R.; SMITH, A. B.; HENDRICKSON, W. A. Structure-Activity Relationships in the Binding of Chemically Derivatized CD4 to gp120 from Human Immunodeficiency Virus. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 50, n. 20, p. 4898-4908, 2007.