



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



THAMARA RODRIGUES DE MELO

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
ANTIBIOFILME DO 2-BROMO-N-FENILACETAMIDA**

JOÃO PESSOA - PB

2021

THAMARA RODRIGUES DE MELO

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
ANTIBIOFILME DO 2-BROMO-N-FENILACETAMIDA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadora: Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

JOÃO PESSOA- PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528i Melo, Thamara Rodrigues de.
Investigação da toxicidade, atividade antifúngica e
antibiofilme do 2-bromo-N-fenilacetamida / Thamara
Rodrigues de Melo. - João Pessoa, 2021.
119 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Atividades antifúngica. 3.
2-bromo-N-fenilacetamida. 4. Cryptococcus neoformans.
5. Biofilme. 6. Citotoxicidade. I. Lima, Edeltrudes de
Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

THAMARA RODRIGUES DE MELO

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME
DO 2-BROMO-N-FENILACETAMIDA**

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Banca examinadora

Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora

Prof^a. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna (Titular)

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo (Titular)

Prof^a. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros
(Universidade Federal de Campina Grande)
Examinador Externo (Titular)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno (Titular)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edmundo e Maria e minha irmã Thamiles.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me deu força e sabedoria para superar todas as adversidades encontradas nessa trajetória.

Aos meus pais, Edmundo e Maria e minha irmã Thamiles, pelo amor, admiração e respeito. Pelo apoio nas horas mais difíceis e compreensão pela minha ausência em muitos momentos.

À **Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima**, por abrir as portas do seu laboratório mesmo não me conhecendo, pela orientação, pelas palavras de incentivo, ensinamentos e oportunidade de concretizar este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Abrahão Alves De Oliveira Filho** e sua equipe pela dedicação e valorosa colaboração com este trabalho.

Aos professores **Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha** pela disponibilidade em participar da minha qualificação e defesa do doutorado, contribuindo de maneira fundamental ao enriquecimento da tese e meu nível acadêmico.

Aos professores **Dra. Francinalva Dantas de Medeiros e Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães**, por aceitarem prontamente o convite para participar dessa banca, mesmo com as adversidades que foram impostas pela pandemia, não mediram esforços para essa colaboração.

A todos professores do **Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para formação profissional.

Às secretárias do Programa, **Caroline Manguiera e Nilmar**, pela presteza, gentileza e prontidão;

A **Universidade Federal da Paraíba**, em especial ao **Centro de Ciências da Saúde** e ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, pela oportunidade de realização deste curso;

A **todos os funcionários do IPeFarM** pela disponibilidade e cooperação.

A **todos do Laboratório de Micologia** contribuíram direta ou indiretamente com idealização desta pesquisa. Em especial a Laisa Cordeiro pelo suporte e disposição em auxiliar nos experimentos.

A **Helivaldo Diogenes e Aleson Pereira** pelas palavras de incentivo, disponibilidade e que tão gentilmente auxiliariam na realização desta pesquisa.

Aos meus amigos, **Maria Carolina, Tassiana, Diego, Manoel Neto, Pedro, Everton, Dalton, Sávio, Hélio, Danilo, Erasmo, Iago, Ramon**, por sempre estarem disponíveis para me escutar, pelos momentos divididos juntos, risadas, alegrias, amizade pela compreensão nos momentos de ausência durante essa trajetória, e principalmente a alegria de concretizar este trabalho. Muito Obrigada!

E meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a idealização desta pesquisa.

RESUMO

MELO, T.R. Investigação da toxicidade, atividade antifúngica e antibiofilme 2- bromo-*N*-fenilacetamida. 119p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos-Área de Concentração: Farmacologia)-CCS/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

A criptococose é uma infecção fúngica causada principalmente pelas leveduras encapsuladas *C. neoformans* e *C. gattii*, podem afetar Sistema Nervoso Central com evolução grave e fatal. Com aumento do número de indivíduos imunossuprimidos, causado pelo HIV e por tratamento de imunossupressores, a casuística da criptococose por *C. neoformans* tem aumentado. Além disso, a terapia convencional com os antifúngicos apresenta dificuldades no que se refere à toxicidade e ao surgimento de linhagens resistentes. Diante desse contexto, a busca por novas substâncias antifúngicas têm sido uma alternativa promissora. As acetamidas são moléculas que possuem diversas atividades biológicas. No entanto, não há relatos sobre a atividade de 2-bromo-*N*-fenilacetamida (A1Br). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme da molécula A1Br e seus efeitos tóxicos. O A1Br foi sintetizado e sua estrutura caracterizada por infravermelho e ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C). Foram utilizados os softwares *Pass online*, *Molinspiration*, *Osiris* e *Docking Molecular* para análise *in silico*. Na análise *in vitro*, avaliação de atividade antifúngica pela técnica de microdiluição em caldo e método de *checkerboard*. a inibição da formação de biofilme pelo ensaio de cristal violeta. A citotoxicidade foi testada contra os eritrócitos do sistema ABO. A molécula A1Br, por meio da análise *in silico*, apresenta 410 atividades biológicas e boa biodisponibilidade oral e risco em efeitos mutagênico, tumorigênico e reprodutivo. No docking molecular, apresenta energia de ligação e interações favoráveis para a ancoragem adequada nas enzimas 6ISJ e 6TZ8, sendo um possível local de ação do A1Br. O composto A1Br promoveu efeito antifúngico com concentração inibitória mínima (CIM), a CIM₅₀ foi de 0,25 - 1 µg/mL com ação fungicida. Na investigação do mecanismo de ação, a CIM na presença de sorbitol permaneceu inalterado. Em contraste, CIM do A1Br aumentou na presença de ergosterol, mostrando um possível mecanismo de ação na membrana plasmática. Além disso, apresenta boa atividade antibiofilme CIMx4, com crescimento de inibição ≥80%. As combinações de A1Br-anfotericina B e A1Br-voriconazol foram antagonistas. A análise de citotoxicidade mostra-se com baixa toxicidade. Na análise fragilidade osmótica mostrou um moderado potencial de estabilidade e proteção a hemólise Estes resultados sugerem que o A1Br representa uma promissora atividade antifúngica e antibiofilme contra *Cryptococcus neoformans*, por um mecanismo envolvendo a complexação com ergosterol, além de apresentar baixa citotoxicidade.

Palavras-chave: 2-bromo-*N*-fenilacetamida; *Cryptococcus neoformans*; Atividade Antifúngica; Biofilme; Citotoxicidade.

ABSTRACT

MELO, T.R. Investigation of toxicity, antifungal and antibiofilm activity 2-bromo-*N*-phenylacetamide. 1p. Thesis (PhD in Natural and Bioactive Synthetic Products - Concentration Area: Pharmacology) - CCS/Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2021.

Cryptococcosis is a fungal infection caused mainly by the encapsulated yeasts *C. neoformans* and *C. gattii*, which can affect the Central Nervous System with severe and fatal evolution. With an increase in the number of immunosuppressed individuals, caused by HIV and by treatment of immunosuppressants, the number of cryptococcosis by *C. neoformans* has increased. In addition, conventional therapy with antifungals presents difficulties with regard to toxicity and the emergence of resistant strains. In this context, the search for new antifungal substances has been a promising alternative. Acetamides are molecules that have several biological activities. However, there are no reports on the activity of 2-bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br). Thus, the present study aimed to evaluate the antifungal and antibiofilm activity of the A1Br molecule and its toxic effects. A1Br was synthesized and its structure is characterized by infrared and nuclear magnetic resonance of Hydrogen (^1H) and Carbon (^{13}C). The software Pass online, Molinspiration, Osiris and Molecular Docking were used for in silico analysis. In in vitro analysis, evaluation of antifungal activity using broth microdilution technique and checkerboard method. the inhibition of biofilm formation by the violet crystal assay. Cytotoxicity was tested against the ABO system erythrocytes. The A1Br molecule, through in silico analysis, has 410 biological activities and good oral bioavailability and risk in mutagenic, tumorigenic and reproductive effects. In molecular docking, it presents binding energy and favorable interactions for adequate anchoring in 6ISJ and 6TZ8 enzymes, being a possible A1Br action site. The A1Br compound promoted antifungal effect with minimal inhibitory concentration (MIC), the MIC₅₀ was 0.25 - 1 μg / mL with fungicidal action. In investigating the mechanism of action, MIC in the presence of sorbitol remained unchanged. In contrast, A1Br MIC increased in the presence of ergosterol, showing a possible mechanism of action on the plasma membrane. In addition, it has good MIC_{x4} antibiofilm activity, with inhibition growth $\geq 80\%$. The combinations of A1Br-amphotericin B and A1Br-voriconazole were antagonists. Cytotoxicity analysis shows low toxicity. In the osmotic fragility analysis, it showed a moderate potential for stability and protection against hemolysis. These results suggest that A1Br represents a promising antifungal and antibiofilm activity against *Cryptococcus neoformans*, due to a mechanism involving the complexation with ergosterol, in addition to presenting low cytotoxicity.

Keywords: 2-bromo-*N*-phenylacetamide; *Cryptococcus neoformans*; Antifungal activity; Biofilm; Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas <i>Cryptococcus</i> spp.....	24
Figura 2. Componentes da cápsula e parede celular <i>Cryptococcus neoformans</i>	24
Figura 3. Possíveis rotas de penetração do <i>Cryptococcus</i> spp. pela barreira hematoencefálica: (1) Mecanismo de Tróia; (2) Transferência lateral; e (3) Transcelular.....	28
Figura 4. Etapas de formação do biofilme	33
Figura 5. Estrutura química da amida sintética 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida (A1Br)	42
Figura 6. Representação da preparação 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida.....	43

Article 1: **Antifungal and Antibiofilm activity of 2-bromo-*N*-phenylacetamide against *Cryptococcus neoformans***

Figure 1. The effect of inhibiting biofilm formation was examined A1Br, amphotericin and voriconazole in concentrations ranging from 1/4 to 4x MIC using the crystal violet stain assay.....	59
Figure 2. The percentage of inhibition of the biofilm formation of the strains was examined at final concentrations of A1Br ranging from 1/4 to 4 x MIC.....	60

Article 2: **Pharmacological and Toxicological analysis of 2-bromo-*N*-phenylacetamide**

Figure 1. Interactions of A1Br with enzymes 6ISJ and 6TZ8.....	77
Figure 2. (a) Cytotoxic effect of A1Br against erythrocytes type A, (b) type B and (c) type O; (C) Negative control (erythrocytes 0.5%), (C +) Positive control (Triton X-100 at 1%).....	82
Figure 3. (a) Anti-hemolytic effect of A1Br against erythrocytes type A, (b) type B and (c) type O; (C-) Negative control (erythrocytes 0.5%), (C +) Positive control (NaCl 0.24%).....	83

Figura A1. Espectro de Infravermelho (KBr) da 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida.....	111
Figura A2. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida...	111
Figura A3. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 101 MHz) da 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida	112

LISTA DE TABELAS

Article 1: **Antifungal and Antibiofilm activity of 2-bromo-*N*-phenylacetamide against *Cryptococcus neoformans***

Table 1. Minimal inhibitory concentration of the A1Br against of *Cryptococcus neoformans*.....58

Article 2: **Pharmacological and Toxicological analysis of 2-bromo-*N*-phenylacetamide**

Table 1. *In silico* analysis of A1Br compared to standard antifungals.....73

Table 2. Enzymes obtained from the PDB, their RMSD and Moldock Score values...76

Table 3. MIC and MFC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for A1Br and standard antifungal against *Cryptococcus neoformans* strains.....78

Table 4. MIC A1Br ($\mu\text{g mL}^{-1}$) on the strains of *Cryptococcus neoformans* in the of sorbitol assay79

Table 5. MIC A1Br ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in *Cryptococcus neoformans* strains for ergosterol assay.....79

Table 6. (a) Association of A1Br and Voriconazole **(b)** Association of A1Br and Amphotericin B on strains of *Cryptococcus neoformans*.....80

LISTA DE QUADROS

Article 2: **Pharmacological and Toxicological analysis of 2-bromo-*N*-phenylacetamide**

Frame 1. Risk of toxicity of A1Br compared to standard antifungals.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC Fluocitosina

A1Br 2-bromo-*N*- fenilcetamida

ABC *ATP-Binding Cassette*

ADMET- Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AFLP *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AIDS Síndrome da imunodeficiência adquirida

AmB Anfotericina B

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASD Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC American Type Culture Collection

BHE Barreira hematoencefálica

CCEN Centro de Ciências Exatas e da Natureza

CCS Centro de Ciências da Saúde

CDCI₃ Clorofórmio deuterado

CFM Concentração Fungicida Mínima

CIFA Concentração inibitória fracionada de A

CIFB Concentração inibitória fracionada de B

CIM Concentração inibitória mínima

CIMA Concentração inibitória mínima de A

CIMB Concentração inibitória mínima de B

CLRs Receptores de lectina do tipo C

CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMRVS Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária

Cna 1 Subunidade A catalítica da calcineurina

Cnb1 Subunidade B reguladora da calcineurina

CsA Ciclosporina A

DMSO Dimetilsulfóxido

EPS Substâncias poliméricas extracelulares

ERG Genes envolvidos na síntese de ergosterol

FK506 Tacrolimus

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz

FLZ Fluconazol

GalXM galactoxilomanana

GXM glucuronoxilomanana

HIV *Human Immunodeficiency Virus*

ICIF Índice de concentração inibitória fracionada

INCQS Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IV Infravermelho

LM Laboratório de micologia

MAT *Mating Type*

MSF *Major Superfamily Facilitator*

NCCLS *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NIAD *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

NLR Receptor do tipo NOD

OMS Organização Mundial de Saúde

P.A Para análise

PASS *online*- Previsão do Espectro de Atividade para Substâncias

PRR Receptores de Reconhecimento Padrão

RMN ¹H Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio ¹

RMN ¹³C Ressonância Magnética Nuclear do Carbono ¹³

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

SNC Sistema Nervoso Central

TLR Receptor do tipo *toll*

TMS Tetrametilsilano

UFC Unidades formadoras de colônias

UFPB Universidade Federal da Paraíba

VGI Variedade *gattii* tipo molecular I

VGII Variedade *gattii* tipo molecular II

VGIII Variedade *gattii* tipo molecular III

VGIV Variedade *gattii* tipo molecular IV

VNI Variedade *neoformans* tipo molecular I

VNII Variedade *neoformans* tipo molecular II

LISTA DE SÍMBOLOS

% Percentual

°C Grau Celsius

µg Micrograma

µg/mL Micrograma por mililitro

mL Mililitro

µL Microlitro

UFC/mL Unidade Formadora de Colônias por mililitro

LogUFC/mL Logaritmo do número de Unidade Formadora de Colônias por mililitro

d Duplete

dd Duplo duplete,

ddd Duplo duplo duplete

m Multiplete

s Singleto

J Constante de acoplamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Aspectos gerais do <i>Cryptococcus</i> spp.	22
2.2 Epidemiologia da criptococcose	24
2.3 Interação do <i>Cryptococcus neoformans</i> com o sistema imune do hospedeiro	26
2.4 Fatores de virulência do <i>Cryptococcus</i> spp.	28
2.4.1 Termotolerância	28
2.4.2 Cápsula	29
2.4.3 Melanina	30
2.4.4 Produção de enzimas.....	31
2.4.5 Biofilme	31
2.5 Terapia antifúngica para Criptococcose	33
2.6 Resistência <i>Cryptococcus</i> spp. aos antifúngicos.....	35
2.7 Derivados de acetanilidas	36
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Local da pesquisa	41
4.2 Substância - teste.....	41
4.2.1 Preparação 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida.....	42
4.2.2 Análise de identificação estrutural e pureza.....	42
4.3 Produtos - controle	43
4.4 Linhagens fúngicas.....	43
4.5 Meios de cultura	44
4.6 Inóculo.....	44
4.7 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	44
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	45
4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	46
4.7.3 Ação do A1Br na parede celular fúngica: Ensaio com sorbitol	46

4.7.4 Ação do A1Br na membrana celular: Interação com ergosterol	46
4.7.5 Potencial de inibição do A1Br na formação do biofilme.....	47
4.8 Análise da associação de A1Br sobre o efeito dos antifúngicos padrões...	47
4.9 Ensaios <i>in silico</i>	48
4.9.1 <i>Pass online</i>	48
4.9.2 <i>Molinspiration</i>	48
4.9.3 <i>Osiris</i>	49
4.9.4 <i>Docking Molecular</i>	49
4.10 Avaliação do efeito do A1Br em eritrócitos humanos	49
4.10.1 Potencial hemolítico.....	49
4.10.2 Fragilidade osmótica.....	50
4.11 Análise de dados	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Antifungal and Antibiofilm activity of 2-bromo- <i>N</i> -phenylacetamide against <i>Cryptococcus neoformans</i>	52
5.2 Pharmacological and Toxicological analysis of 2-bromo- <i>N</i> -phenylacetamide	63
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXO A.....	112
ANEXO B.....	115

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas têm aumentado significativamente nas últimas décadas como resultado do crescente número de indivíduos imunodeficientes. Esses indivíduos são particularmente mais propensos a infecções causadas por patógenos fúngicos de natureza oportunista, embora indivíduos imunocompetentes também possam ser acometidos, em alguns casos (BUTTS; PALMER; ROGERS, 2017).

A prevalência dessas infecções é preocupante devido as elevadas taxas de morbidade e mortalidade estão associadas mesmo com a intervenção terapêutica, relacionadas aos agentes *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (ZARAGOZA, 2019).

A criptococose é uma das infecções fúngicas cosmopolita negligenciada e oportunista, que vem assumindo papel de destaque devido à sua grande incidência em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Na África Subsaariana, a criptococose meníngea é o tipo mais comum de meningite em adultos infectados pelo HIV. De um total de 223.100 casos de criptococose meníngea que foram estimados como tendo ocorrido globalmente em pessoas vivendo com HIV em 2014. O terceiro maior número de casos no mundo foi da América Latina, com uma incidência estimada de 5.300 casos por ano. Destes, Brasil e Colômbia foram os países com maior incidência, entre 1.001 a 2.500 casos, seguidos pela Argentina e México, com uma incidência de 501 a 1.000 casos (RAJASINGHAM *et al.* 2017).

O gênero *Cryptococcus* compreende mais de 100 espécies, sendo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* os principais agentes etiológicos da criptococose. Porém, outras espécies de *Cryptococcus*, as quais são classicamente consideradas não patogênicas, como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, entre outras, estão emergindo como patógenos oportunistas ao longo dos anos (CLEVELAND; GELFAND; RAO, 2013; MAY *et al.*, 2016).

A infecção, causada pelas leveduras *C. neoformans* e *C. gattii*, ocorre pela após a inalação de esporos ou leveduras dessecadas, encontradas em fontes ambientais, causando infecção pulmonar e podendo atingir o Sistema Nervoso Central (SNC) (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; SQUIZANI *et al.*, 2018).

A capacidade desse patógeno de infectar o hospedeiro humano e causar a doença está relacionada a sua capacidade de produzir e secretar fatores de virulência que garantam sua sobrevivência no hospedeiro, através da modulação do sistema imune e de alterações

morfofisiológicas no fungo, destacam-se a cápsula polissacarídica que circunda a parede celular, a síntese de melanina, a secreção de exoenzimas como urease, protease e fosfolipase, capacidade de crescimento a 37 °C e biofilme (BIELSKA *et al.*, 2018; ZARAGOZA, 2019).

O tratamento da criptococose está relacionado à utilização de medicamentos padronizados pelo NIAID (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), através do *Mycose Study Groups, Infections Disease Society of America*. Dentre os agentes antifúngicos, é mais comum o uso da anfotericina B (AmB), 5- fluocitosina (5-FC) e azólicos como fluconazol (FLZ), administrados em associação ou de forma individualizada. No início do tratamento geralmente é usado a Anfotericina B associado 5- fluorocitosina, onde para os tratamentos mais prolongados é recomendado o uso de fluconazol (PERFECT *et al.*, 2010; PERFECT; BICANIC, 2015).

O uso prolongado do fluconazol durante a terapia da criptococose, principalmente em pacientes com AIDS, pode ocasionar a resistência do *Cryptococcus* spp. Desta forma, utiliza-se outros derivados dos compostos dos azólicos, incluindo itraconazol, voriconazol e posaconazol, também tem sido utilizado na terapia da criptococose devido a resistência *in vitro* entre os isolados de *Cryptococcus* spp. ao fluconazol (MAZIARZ; PERFECT, 2016; DE AZAMBUJA *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de linhagens resistentes aos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose, bem como a toxicidade, os elevados custos dos medicamentos, interações medicamentosas, biodisponibilidade insuficiente tem motivado a busca de alternativas para caracterização de novos alvos. A modelagem de novos fármacos pode oferecer além de viabilidade socioeconômica, tecnológica e industrial, tratamento apropriado e eficiente baseado na melhor especificidade da atividade de novas moléculas, principalmente nos casos de linhagens resistentes (NEGRI *et al.*, 2014).

Nesta perspectiva, várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema da resistência dos micro-organismos, sendo uma delas a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Compostos isolados de fontes vegetais fornecem moldes estruturais para a obtenção de substâncias sintéticas. Portanto, a pesquisa para novas alternativas terapêuticas baratas, potentes e seguras é necessário e tem sido perseguido por vários grupos (BIRHAN, BEKHIT, HYMETE, 2014; COIMBRA *et al.*, 2013; GÓMEZ- PÉREZ *et al.*, 2014; BONANO *et al.*, 2014; GELLIS *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2012).

Neste contexto, a amida é um grupo tem sido encontrado em abundância na natureza como produtos naturais (KUNG *et al.* 2010) proteínas e em polímeros biológicos e sintéticos (GLOMB; PFAHLER, 2001). Já foram descritas como atividade anti-inflamatória, analgésica, antitumoral (KENNEDY, 2001), antiparasitária (BRASIL *et al.*, 2017; ÁLVAREZ *et al.*, 2015) e antimicrobiana (GEORGIEV *et al.*, 2012; KHATKAR *et al.*, 2014). Consequentemente, uma das famílias das amidas sintéticas tem sido descrita é acetanilida.

A acetanilida é amida secundária, desempenha importantes papéis fisiológicos e biológicos no Reino Animal. Os derivados de acetanilida foram investigados por suas atividades biológicas, incluindo anti-inflamatório (SRIKAMTH *et al.*, 2013), analgésica (VERMA *et al.*, 2014), antipirético (KUMAR *et al.*, 2013), antifúngico (PATTAN *et al.*, 2006), antibacteriano (PATTAN *et al.*, 2006; KONDA *et al.*, 2014), hipoglicemiante (ROY *et al.*, 2013), antioxidante (KARATA *et al.*, 2005) e anti-malárico (MASHERLKAR *et al.*, 2012). Desempenham um papel vital no campo da química medicinal, regulando várias reações farmacológicas e também uma enorme variedade de moléculas sintéticas, incluindo diversos medicamentos como por exemplo: diclofenaco de sódio, acetaminofeno, indometacina, fenacetina, fenilbutazona, procainamida, lidocaína e sulfatiazol (SINGH; KUMAR; MISHRA, 2018).

No estudo de Pattan *et al* (2006) sintetizou uma série de novos derivados de acetanilida foram selecionados para avaliar atividade antibacteriano *in vitro* pelo método da placa discal contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Os compostos sintetizados mostraram atividade potente inibindo quando a comparação foi feita com o antibacteriano e antifúngico padrão. A zona de inibição de todos os compostos sintetizados estava na faixa de 8-32 mm. Já, Konda *et al* (2014) sintetizou vários derivados de sulfonamida tendo núcleo acetanilida. Os compostos foram avaliados por sua atividade antibacteriana por ensaios de difusão contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* usando estreptomicina como o padrão de referência. Apenas composto derivado apresentou a atividade antibacteriana.

Nesse contexto, os derivados de acetanilida têm sido alvo de estudos, devido às suas atividades antimicrobianas promissoras. Até o presente momento, na literatura não há estudos no que diz respeito à atividade antifúngica do 2-bromo-*N*- fenilcetamida. Porém, há estudos com derivados de cloroacetamidas, no qual Katke *et al.*, (2011) avaliou a atividade antifúngica e antibacteriana destes derivados e consideraram uma forte atividade antimicrobiana.

Diante da importância clínica e alta incidência da criptococose, aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, surgimento de linhagens resistentes e toxicidade dos antifúngicos existentes, a busca por novos agentes antifúngicos e alternativas terapêuticas se faz necessário, sendo 2-bromo-*N*-fenilacetamida candidato para esse propósito. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica e antibiofilme desse composto contra linhagens de *Cryptococcus neoformans*, com o intuito de contribuir com a descoberta de substância antifúngica mais eficaz no combate a este gênero fúngico. Ainda, é importante avaliar a toxicidade *in vitro* objetivando determinar sua segurança, bem como determinar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos, através de ferramentas de previsão, com o propósito de determinar sua possível aplicabilidade terapêutica.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do *Cryptococcus* spp.

A criptococose é uma infecção causada pela inalação de propágulos infectantes do fungo pertencente ao Filo Basidiomycota, classe dos Tremellomycetes e ao gênero *Cryptococcus*, sendo as leveduras mais patogênicas: as espécies do complexo *C. neoformans* e as espécies do complexo *C. gattii* que conduzem a primoinfecção pulmonar, podendo disseminar-se hematogenicamente, com especial afinidade pelo SNC, as quais diferem em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (KWONG-CHUNG *et al.*, 2017).

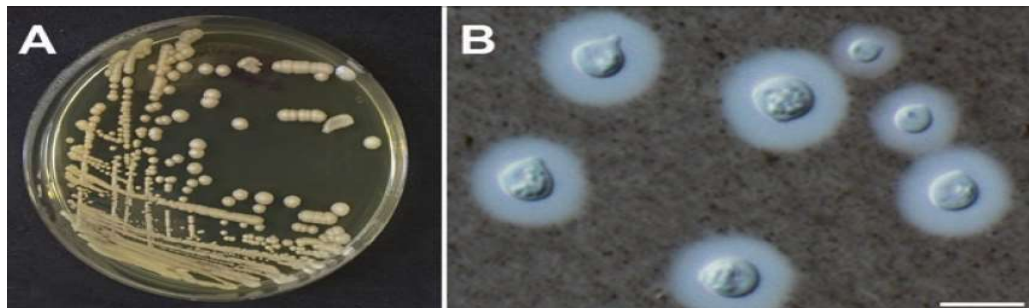
As leveduras do gênero *Cryptococcus* compreende mais de 100 espécies e estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em solo, excretas de aves, poeira, folhas e madeira em decomposição (NYAZIKA *et al.*, 2018; ZARAGOZA, 2019; ZAVALA; BADDLEY, 2020). Além disso, esse fungo pode infectar diferentes espécies de mamíferos como gatos, cachorro, coelho, ratos e eventualmente sendo também capaz de infectar seres humanos, onde pode causar a criptococose (LIN; HEITMAN, 2006).

A célula de *Cryptococcus* spp. possui uma forma esférica ou globular, com diâmetro aproximado de 5 a 10 micrômetros, formado por brotamento único ou múltiplo e apresenta em sua grande maioria uma cápsula constituída por mucopolissacarídeos, sendo 90% glucoronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM), ácido glucurônico, xilose e manose, visualizada por microscopia ótica utilizando a coloração de tinta nanquim ou microscopia de contraste de fase. Na macroscopia, as colônias têm coloração branca a creme, brilhante, com textura mucoide, margem lisa e inteira, com crescimento em 72 horas de incubação em temperatura 37 °C, utilizando-se para isso os meios como Agar Sabourad dextrose (ASD) sob condições aeróbias, conforme a Figura 1 (NEGRONI, 2012; GODINHO *et al.*, 2017).

A parede celular é estruturada em duas camadas interna e externa. A camada interna é composta por β -glucanas, quitina, assim como manoproteínas e melanina que são mais abundantes, apesar de estarem distribuídas por toda a parede celular. A camada externa é composta majoritariamente por α e β -glucanas (AGUSTINHO *et al.*, 2018). Dentre as glucanas, a 1,3- β -glucana tem a função de estruturação da parede celular, ocorrendo em um polímero longo. Este polímero é ramificado em pequenas cadeias de 1,6- β -glucanas, que auxiliam no crosslink entre os polímeros de glucana, assim como com quitinas e glicoproteínas

(GOW; LATGE; MUNRO, 2017). As quitinas contribuem com a manutenção da integridade e flexibilidade da parede celular (BANKS *et al.*, 2005), conforme a Figura 2.

Figura 1. Características morfológicas *Cryptococcus* spp.

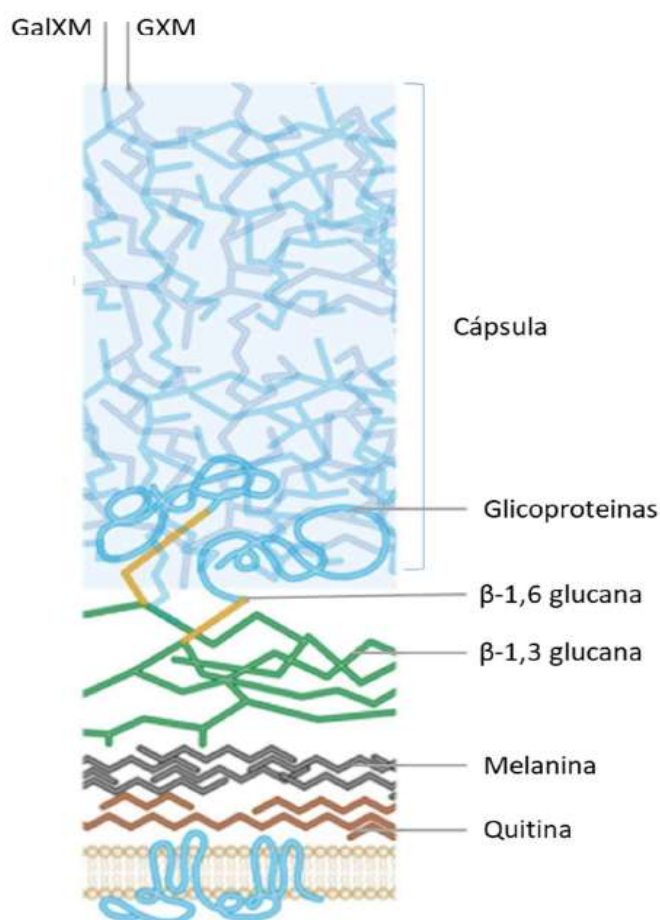


A: Macromorfologia, colônias após 72 horas de crescimento em ASD a 37° C, apresentando coloração branca a creme, com textura brilhante.

B: Micromorfologia: presença de leveduras encapsuladas com brotamento único pela coloração tinta nanquim.

FONTE: (GODINHO *et al.*, 2017).

Figura 2. Componentes da cápsula e parede celular *Cryptococcus neoformans*.



Fonte: Adaptado de (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

Dentro do gênero *Cryptococcus*, foi descrito o complexo *C. neoformans/C. gatti*, mas, atualmente, diferenças consideráveis foram documentadas entre o complexo de *C. neoformans* e o complexo *C. gattii* (HAGEN *et al.*, 2015). Com base na diversidade fenotípica e genotípica entre *C. gattii/C. neoformans*, o complexo foi dividido em sete genótipos haploides e quatro híbridos. Dessa forma, o *Cryptococcus gattii lato sensu* foi separado em cinco espécies; *C. gattii stricto sensu* (sorotipo B, genótipo AFLP/VGI), *C. bacillisporus* (sorotipo C, genótipo AFLP5/VGIII), *C. deuterogattii* (sorotipo B, genótipo AFLP6/VGII), *C. tetragattii* (sorotipo C, genótipo AFLP7/VGIV) e *C. decagattii* (sorotipo B, genótipo AFLP10). *Cryptococcus neoformans lato sensu*, por sua vez, atualmente compreende as espécies *C. neoformans stricto sensu* (antiga var. *grubii*; AFLP1/VNI, AFLP1A/VNB/VNII) e *C. deneoformans* (antiga var. *neoformans*; AFLP2/VNIV) (KWON-CHUNG *et al.*, 2017).

A reprodução ocorre de forma assexuada, por brotamento único ou múltiplo. Grande parte dos isolados clínicos e ambientais apresentam-se na forma anamórfica haplóide, mas também pode se reproduzir sexuadamente na forma teleomórfica (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

A reprodução sexuada possui um sistema “Mating Type” (MAT) que apresenta dois tipos celulares, α e a . O locus de MAT codifica genes para a produção e detecção de feromônio. A célula MAT α produz feromônio MF α que é detectado pela célula MAT a , esta responde ao estímulo produzindo um tubo de conjugação, e MAT a produz o feromônio MF a que é detectado pela célula MAT α que responde ao estímulo aumentando o volume celular e favorecendo a esporulação onde os núcleos MAT a e MAT α se fundem e ocorrem repetidas meioses. Os esporos são dispersos no ambiente e germinam em células de leveduras haplóides (BOVERS *et al.*, 2008; CHUN; MADHANI, 2010). Quando há ausência de células MAT a - α a reprodução pode ocorrer entre células de um mesmo tipo, por meio da autofilamentação (LIN, 2009).

2.2 Epidemiologia da criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica causada por alguns fungos do gênero *Cryptococcus*, incluindo os complexos *C. neoformans* e *C. gattii*. É uma doença amplamente distribuída pelo mundo e pode ter diversas apresentações clínicas, sendo a principal a meningoencefalite criptocócica (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A espécie *C. neoformans* apresenta distribuição global e é encontrada geralmente associada a excretas de aves, sendo considerada a principal espécie patogênica do gênero

(MAY *et al.*, 2016; ZAVALA; BADDLEY, 2020). *C. gattii* já foi reconhecida como uma espécie endêmica de regiões tropicais e subtropicais, sendo facilmente encontrada em associação com o solo, cascas de eucaliptos ou árvores nativas de regiões endêmicas (KIDD *et al.*, 2007; LOCKHART *et al.*, 2013; MAY *et al.*, 2016).

As estimativas é que ocorram cerca de 223.100 casos de meningite por *Cryptococcus* spp. no mundo, sendo 73% desses casos na África sub-saariana. Também foi estimada a morte anual por essa doença, sendo 181.100 casos no mundo e com 135.000 ocorrendo na África sub-saariana. Estima-se que 15% das mortes de portadores da AIDS são causadas por meningite criptocócica (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

A meningite criptocócica é a segunda infecção oportunista associada ao HIV com risco de vida mais comum depois da tuberculose. A prevalência da infecção por *Cryptococcus neoformans* entre os pacientes infectados pelo HIV é de até 40% na maior parte do mundo, particularmente na África Subsaariana e no Sudeste Asiático, que são considerados os epicentros de HIV / AIDS (LOYSE *et al.*, 2013; ODEGBEMI *et al.*, 2019).

De acordo com o relatório do Programa das Nações Unidas sobre AIDS (UNAIDS) de 2019, cerca de 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo viviam com HIV em 2018. No mesmo ano, cerca de 1,7 milhões de pessoas foram infectadas e 700.000 pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS em todo o mundo. Apesar da crescente disponibilidade de tratamento anti-retroviral, a doença criptocócica continua a ser uma das principais causas de morte entre pacientes infectados pelo HIV nos países em desenvolvimento (UNAIDS, 2019).

Na América Latina ocorrem mais de 5 mil casos de meningite criptocócica por ano, causando a morte de aproximadamente 2.400 pessoas, sendo *C. neoformans* a espécie mais prevalente (FIRACATIVE *et al.*, 2018). Os índices ainda permanecem altos nos países como Brasil, Colômbia, México e Argentina figuram como os países de maior incidência da meningite criptocócica na América Latina (RAJASINGHAM *et al.*, 2017; DE AZAMBUJA *et al.*, 2018; FIRACATIVE *et al.*, 2018;). Entretanto, no Brasil, não havia notificação compulsória, dessa maneira, dificultava o conhecimento da real magnitude da morbidade e da mortalidade da doença no país. O conhecimento existente era obtido principalmente a partir de estudos de séries de caso (MORA *et al.*, 2012). Porém, o Ministério da Saúde na portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, inclui a criptococose na lista nacional de notificação compulsória.

2.3 Interação do *Cryptococcus neoformans* com o sistema imune do hospedeiro

A infecção ocorre através da inalação das formas infectantes da levedura, os basidiósporos, os quais são encontrados no meio ambiente, normalmente no solo contaminado com excremento de aves e vegetais em decomposição. Em decorrência desta, as manifestações geralmente ocorrem na forma pulmonar e cerebral, muitas vezes causando o estado mais severo da doença, meningocéfalite (NEGRONI, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2020). As leveduras colonizam, primeiramente, o tecido alveolar, caracterizando a infecção pulmonar como infecção primária da criptococose, a qual pode se desenvolver em forma aguda, subaguda ou crônica (STIE; FOX, 2012). Nos tecidos pulmonares, a doença pode permanecer em estágio de latência por anos, ou manifestar-se por meio de sinais e sintomas bem variáveis, desde forma assintomática ou até desenvolver pneumonia grave e insuficiência respiratória (BRIZENDINE, BADDLEY; PAPPAS, 2011; MAY *et al.*, 2016).

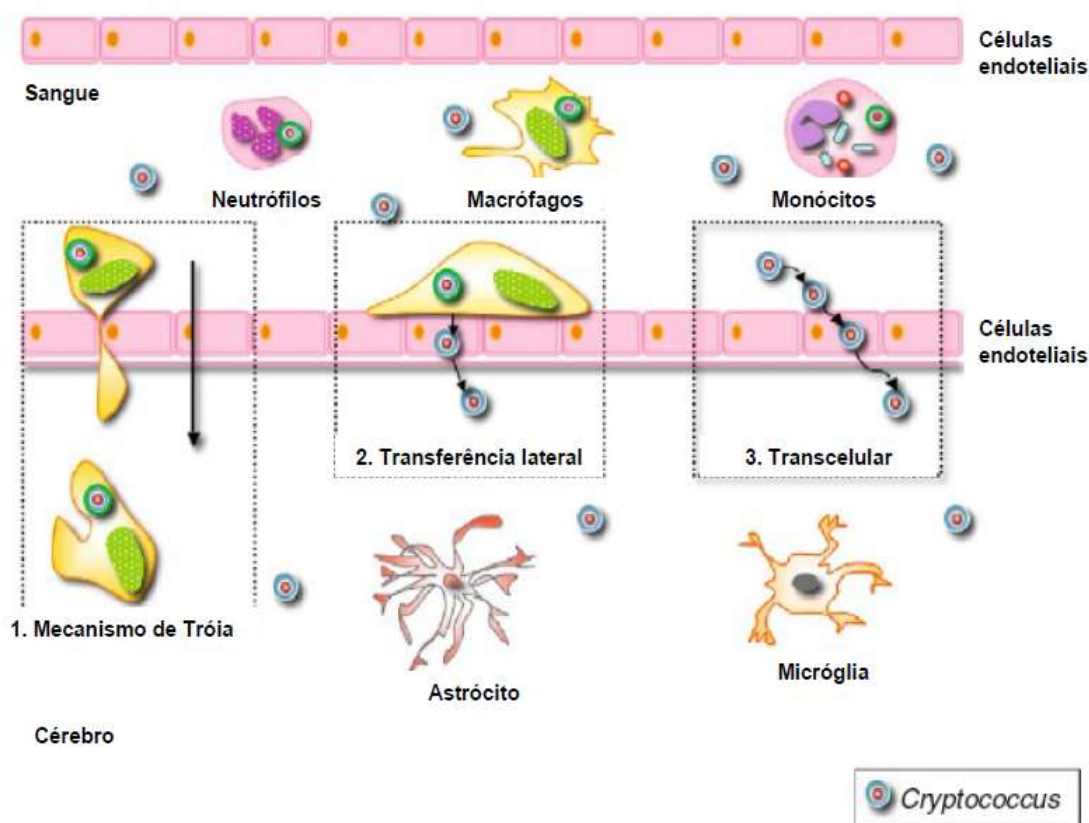
A interação do fungo com as células do sistema imune do hospedeiro envolve tanto a resposta inata quanto a adaptativa. Assim que o fungo chega ao trato respiratório inferior encontra com macrófagos alveolares, que já residem no tecido. Para que ocorra o reconhecimento ou e/ou internalização do *C. neoformans*, sabe-se que as células imunes podem se utilizarem de proteínas do complemento, anticorpos ou dos receptores de reconhecimento padrão (PRR). Destes os principais PRR são receptores do tipo toll (TLR), os receptores de lectina do tipo C (CLRs), receptores do tipo NOD (NLR), entre outros (HEUNG, 2017).

A indução de uma resposta específica do sistema imune inato contra a criptococose ocorre através da secreção de quimiocinas, citocinas, indução da ativação co-estimulatória de células fagocíticas e apresentação de antígenos, realizado pelas células dendríticas (ERWIG; GOW, 2016).

As células dendríticas realizam a fagocitose para o processamento de antígenos do fungo, para assim apresenta-los para as células T auxiliaadoras nos órgãos linfoides. Após o processo de diferenciação, podendo se tornar do perfil Th1, caracterizadas pela indução citocinas pró-inflamatórias como IL-6, INF- γ , TNF-alfa pode induzir a formação de granulomas pulmonares tendo um papel importante na contenção da disseminação da doença para outros órgãos; perfil Th17, produzindo principalmente IL-17; e perfil Th2, com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13; sendo esse perfil associado à disseminação na resposta a *C. neoformans* (ELSEGEINY *et al.*, 2018; CAMPUZANO; WORMLEY, 2018).

A disseminação do fungo pode ocorrer por via hematogênica ou linfática (Figura 3), podendo afetar diversos órgãos e tecidos. No entanto, é sabido que esse fungo possui tropismo pelo SNC, sendo esse um ponto-chave na patogênese. Atualmente existem 3 hipóteses principais de como *C. neoformans* atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) para chegar ao SNC. A primeira é através do mecanismo denominado “cavalo de tróia”, na qual fagócitos mononucleares transportam o patógeno em seu interior até o destino final onde são liberados por exocitose lítica ou não lítica. O segundo mecanismo compreende a capacidade do fungo em infectar outras células a partir da célula hospedeira sem serem expostos ao meio extracelular, sendo esse processo denominado transferência lateral (paracitose), que envolve a protease fúngica Mpr1 e a enzima urease. Já o terceiro mecanismo é a transcitose endotelial corresponde um processo na qual as leveduras atravessam as células endoteliais dos vasos sanguíneos de forma direta, em um processo que é mediado pelo ácido hialurônico na cápsula do fungo e pelo receptor CD44 do hospedeiro (MA; MAY, 2009; MAY *et al.*, 2016).

Figura 3. Possíveis rotas de penetração do *Cryptococcus* spp. pela barreira hematoencefálica: (1) Mecanismo de Tróia; (2) Transferência lateral; (3) Transcelular



Fonte: (MA; MAY, 2009).

Assim, uma resposta imune "bem-sucedida" à infecção criptocócica parece ser uma mistura complexa de respostas Th1, Th2 e Th17, que devem ser contra-reguladas para prevenir o crescimento descontrolado de fungos ou níveis prejudiciais de inflamação, como também auxilia para que não ocorra a disseminação do *Cryptococcus neoformans* (MAY *et al.*, 2016).

Entretanto, o impacto em pacientes com imunossuprimidos ocorre devido ao mecanismo imune para o controle e eliminação desse fungo envolve os fagócitos, como macrófagos, e células T auxiliaadoras (MILLER; MITCHELL, 1991). Por esta razão, pacientes com AIDS são um dos principais grupos de risco para o desenvolvimento da criptococose, uma vez que estes têm uma redução progressiva de suas células T devido a infecção pelo HIV (DEEKS *et al.*, 2015). Entre outros grupos de risco encontram-se transplantados, pacientes sob uso prolongado de corticoides ou doença crônica renais (BRIZENDINE *et al.*, 2013).

2.4 Fatores de virulência do *Cryptococcus* spp.

Os fatores de virulência são características presentes em um microrganismo capazes de gerar dano ao hospedeiro e podem incluir mecanismos e estruturas que possam auxiliar a sobrevivência desse patógeno (PIROFSKI; CASADEVALL, 2015).

De modo geral, os principais fatores de virulência apresentados por esse fungo são a termotolerância, a cápsula, a melanina, a produção de enzimas e biofilme (AZEVEDO *et al.*, 2016).

2.4.1 Termotolerância

A termotolerância é a capacidade do patógeno de sobreviver e proliferar em temperaturas acima da temperatura ambiente. A resistência a mudança de temperatura está diretamente relacionada com vias de sinalização através da expressão de genes, que desempenham importante papel na adaptação às altas temperaturas e na transição da forma de micélio para levedura (BRUNKE *et al.*, 2016).

A rede complexa de vias de sinalização *C.neoformans* que contribui para a adaptação à temperatura do hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2016) corresponde as vias que controlam o retículo endoplasmático a resposta ao estresse, reprogramação pós-transcricional, parede celular, membrana, inclui a via dependente de Ras1, Pkc1, dependente de Mpk1, vias de

sinalização MAPK e a via de resposta ao estresse mediada pela calcineurina (ODOM *et al.* 1997; KOZUBOWSKI *et al.* 2009; MAENG *et al.* 2010; BAHN;JUNG 2013; GLAZIER;PANEPINTO 2014).

A calcineurina de *C. neoformans* é uma proteína conservada específica de serina / treonina fosfatase que consiste em uma subunidade A catalítica (Cna1) e uma subunidade B reguladora (Cnb1) (FOX;HEITMAN 2002). A atividade da calcineurina é inibida pelas drogas imunossupressoras ciclosporina A (CsA) e tacrolimus (FK506) via ligação a ciclofilinas, ciclofilina A (codificada por dois genes ligados, CPA1 e CPA2) e FKBP12, respectivamente (ODOM *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2001). A subunidade regulatória Cnb1 não é apenas necessária para a atividade da calcineurina, mas também medeia a ligação de ambos os ciclofilina A-CsA e FKBP12-FK506 para calcineurina (FOX *et al.*, 2001). A ativação de Cna1 envolve a ligação de Cnb1 e mudanças conformacionais em Cna1 desencadeadas por calmodulina (ODOM *et al.*, 1997). Após a liberação de cálcio ativada pelo estresse, a calcineurina desfosforila a transcrição ativador Crz1, que promove a translocação de Crz1 para o núcleo e diferencial expressão de vários genes envolvidos na adaptação ao estresse (LEV *et al.*, 2012; CHOW *et al.*, 2017).

2.4.2 Cápsula

A cápsula é a estrutura complexa composta principalmente por dois tipos de polissacarídeos: GXM e GalXM. Existem outros componentes menores, que são manoproteínas e estruturas semelhantes à quitina. A estrutura da varia de acordo com as condições ambientais (HEISS *et al.*, 2009; ZARAGOZA *et al.*, 2019).

Sendo considerada, o maior fator de virulência para *C. neoformans*, uma vez que confere ao fungo propriedades anti-fagocíticas e modulação da resposta imune (ZARAGOZA *et al.*, 2019). Estudos apontam que infecções causadas por cepas acapsulares ou pobremente capsuladas são menos virulentas; ou ainda linhagens altamente encapsuladas são menos fagocitadas por macrófagos, o que diminui a proliferação de células T e apresentação de antígenos pelos macrófagos, assim como também reduz a disseminação sistêmica (VECCHIARELLI *et al.*, 2013; ZARAGOZA *et al.*, 2019).

A síntese da cápsula polissacarídica envolve dezenas de genes como o CAP10, CAP59, CAP60 e CAP64 considerados essenciais para a biossíntese de GXM (Bose *et al.*, 2003; Janbon, 2004) e a especificidade antigênica dos sorotipos em A, B, C, D e AD é determinada pelo principal polissacarídeo capsular, a GXM sendo baseado pelas diferenças

estruturais no número de resíduos de xilose e o grau de O-acetilação de grupos hidroxilas da GXM (ZARAGOZA *et al.*, 2019).

Além disso, a formação da cápsula responde a uma variedade de sinais do hospedeiro, como os níveis de glicose, ferro e CO₂, que são detectados em parte por meio do receptor acoplado à proteína G, Gpr4, e do AMP cíclico / proteína quinase A (cAMP/Via PKA). Esta via coordena a produção de cápsulas por múltiplos mecanismos, incluindo a regulação da atividade de fatores de transcrição, como Rim101 e Nrg1. Estudos indicam que a via cAMP/PKA também impacta o sistema proteassoma da ubiquitina e o proteassoma para influenciar a biossíntese da cápsula (MAYER; KRONSTAD, 2020).

2.4.3 Melanina

A melanina é um pigmento geralmente castanho, carregado negativamente, hidrofóbico, de alto peso molecular, que é formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, geralmente complexados com proteínas ou carboidratos (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). Este pigmento também aumenta a resistência à anfotericina B e afeta a suscetibilidade ao fluconazol. Em espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*, a produção de melanina é dependente da ação enzimática da lacase sobre os compostos bifenólicos e para síntese é necessário que a enzima lacase oxide um precursor de catecolamina, como o L-DOPA. Cepas que possuem alguma deficiência na produção de lacases, e consequentemente de melanina, tem virulência reduzida (GROSSMAN; CASADEVALL, 2017).

Notavelmente, o neurotropismo de *C. neoformans* é parcialmente atribuível à sua capacidade de converter neurotransmissores catecolaminas, incluindo dopamina, norepinefrina e epinefrina, em melanina (CAMACHO *et al.*, 2019). Além disso, a melanina confere proteção ao fungo contra danos oxidativos causados estresse ambiental, radiação ultravioleta (UV), dissecação, temperaturas extremas (AGUSTINHO *et al.*, 2018).

A rede de sinalização para melanização de *C. neoformans* consiste em quatro núcleos fatores de transcrição (Hob1, Bzp4, Usv101 e Mbs1) por meio da expressão de LAC1 em condições de baixo teor de nutrientes e a presença de um precursor da melanina (por exemplo, 3,4-dihidroxifenilalanina [DOPA]). Esses fatores de transcrição estão envolvidos em interações epistáticas complexas na melanização, desde a detecção do estresse nutricional até a síntese de melanina, transporte e deposição da melanina dentro da parede celular. Cada um dos

fatores de transcrição induz a expressão de LAC1 e modula as interações epistáticas entre as vias de sinalização o cAMP, RAM e HOG (LEE *et al.*, 2019; CORDERO *et al.*, 2020).

2.4.4 Produção de enzimas

As enzimas produzidas por *C. neoformans* que são consideradas de maior importância para a virulência são as fosfolipases, proteases e a urease. Estas enzimas desempenham papel fundamental no metabolismo fúngico, além de estarem envolvido na patogênese da infecção de forma a causar dano tecidual ao hospedeiro e fornecer nutrientes necessários a manutenção do micro-organismo (BRUNKE *et al.*, 2016).

As fosfolipases tem a função de quebrar de fosfolipídios componentes da membrana celular, ocasionando a lise das células do hospedeiro infectado, a principal é fosfolipase B, que permite ao fungo degradar as membranas dos fagócitos, podendo ajudar o acesso de nutrientes dentro do fagolisossomo, ou até mesmo no processo de exocitose não-lítica (COELHO *et al.*, 2014). Além disso, essa enzima auxilia na sobrevivência e disseminação intracelular da levedura para no pulmão e no cérebro (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

As proteases são enzimas que degradam proteínas, como colágeno, elastina e fibrinogênio, e favorecem a quebra de imunoglobulinas e fatores do complemento, levando ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A degradação destas proteínas causa danos teciduais ou vasodilatação, fazendo com que ocorra a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro. Além disso, a produção de serino protease que facilita a permeabilidade da BHE (MA; MAY, 2009; CASADEVALL *et al.*, 2018).

As ureases são metaloenzimas dependentes de Ni^{2+} , codificadas pelo gene *URE1* e tem a propriedade de catalisar a hidrólise da ureia em amônia e carbamato, em condições fisiológicas, promovendo alteração do pH. Essa enzima ajuda a neutralizar o pH dentro do fagolisossomo e facilita para a invasão do SNC (MAY *et al.*, 2016).

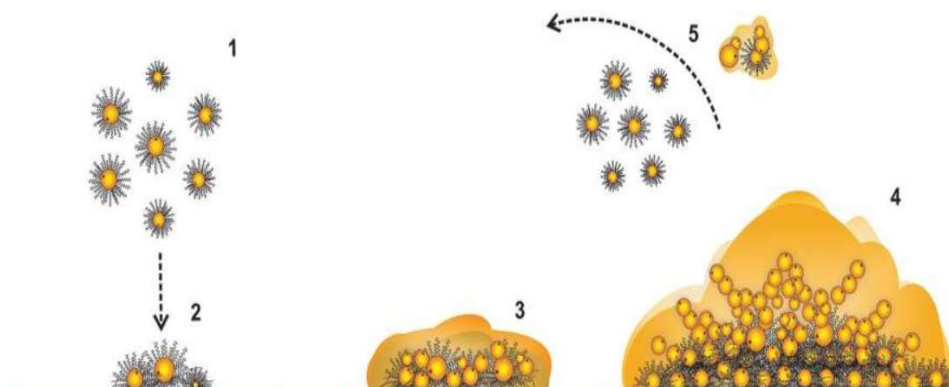
2.4.5 Biofilme

A formação de biofilme constitui um importante fator de virulência para *Cryptococcus* spp., pois confere um aumento da resistência à terapia antifúngica por limitar a penetração dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular, além de uma proteção às células fúngicas da resposta imune do hospedeiro e do estresse ambiental (SANTOS *et al.*, 2015; DE MELLO *et al.*, 2017).

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana organizada envolta em uma complexa matriz extracelular composta por 10-25% de células e 75-90% de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A EPS geralmente contém polissacarídeos (em torno de 40%), proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outras substâncias poliméricas, além de outras moléculas que podem interagir entre si e com a superfície celular fúngica, formando uma rede robusta e protetora, hidratadas a 85-95% de água (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017).

A formação é um processo complexo (Figura 4) ocorrendo como uma sequência de eventos moleculares e fisiológicos envolvendo mudanças físicas, químicas e biológicas que pode ser descrita em cinco etapas: (1) adesão das células à superfície biótica ou abiótica, (2) divisão celular e proliferação, (3) secreção de substância polimérica extracelular que aprisiona as células e facilita a adesão célula-célula e célula-superfície, tendo como consequência a formação de microcolônias, (4) maturação da estrutura tridimensional, provendo um suporte estrutural para a arquitetura do biofilme e (5) dispersão das células em torno do substrato (DE MELLO *et al.*, 2017).

Figura 4. Etapas de formação do biofilme.



FONTE: (LOPES *et al.*, 2017).

Durante a formação de biofilme, ocorre um mecanismo de comunicação entre microrganismos, dependente da densidade celular, conhecido como *quorum sensing* que é caracterizado pela liberação de moléculas de sinalização que afetam o metabolismo microbiano e a expressão gênica de forma sincronizada, alteram a suscetibilidade antifúngica e consequentemente a resistência (PADDER *et al.*, 2018). Dentre as moléculas de sinalização *quorum* secretado para virulência *Cryptococcus neoformans*, Qsp1 é um peptídeo regula três fatores de transcrição para controlar a integridade da parede celular e reprodução (SUMMERS *et al.*, 2020).

A formação de biofilme é influenciada por diversas variáveis relacionadas ao hospedeiro, à espécie e a fatores ambientais. O meio circundante e condições nutricionais, pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, sistema imunológico do hospedeiro, alteram a formação e arquitetura do biofilme e, a suscetibilidade antifúngica e consequentemente a resistência (RAMAGE *et al.*, 2012; COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017).

Os mecanismos moleculares que conferem resistência aos fármacos antifúngicos em biofilmes não foram completamente elucidados. Todavia, os principais mecanismos envolvidos são: aumento da densidade celular; estado fisiológico em que as células se encontram; a presença de células persistentes; a matriz exopolimérica; aumento da expressão de genes relacionados aos alvos das drogas e a resistência mediada por bomba de efluxo (RAMAGE *et al.*, 2012; CAMACHO; CASADEVALL, 2018).

2.5 Terapia antifúngica para Criptococcose

A escolha do tratamento da criptococose depende do local da infecção, do estado imunológico do hospedeiro, da possível doença de base e da toxicidade dos medicamentos (PERFECT *et al.*, 2010). Normalmente os antifúngicos preconizados são anfotericina, flucitosina e fluconazol, podendo ser utilizados isoladamente ou de forma combinada (PERFECT; BICANIC, 2015).

Na meningoencefalite criptocócica, o tratamento é dividido em três fases: indução, consolidação e manutenção. A fase de indução, etapa inicial do tratamento, está relacionada a redução da carga fúngica. A etapa de consolidação é instituída após a fase de indução, quando o paciente apresenta melhora clínica e parâmetros laboratoriais normais. A fase manutenção ocorre logo após o tratamento efetivo e com a finalidade de evitar recaídas, principalmente em hospedeiros imunodeficientes (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; PERFECT *et al.*, 2010, LOYSE *et al.*, 2013; PERFECT; BICANIC, 2015; SPADARI *et al.*, 2020).

O tratamento da criptococose inicia-se com uma terapia de ataque, por um período de duas a quatro semanas é recomendado tanto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) quanto pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA). Esta terapia, também conhecida como “padrão ouro” composta pela associação de anfotericina B (0,7 - 1,0 mg/Kg/dia) e 5-fluocitosina (100 mg/Kg/dia). Entretanto, no Brasil, não há comercialização da fluocitosina (PERFECT *et al.*, 2010; GULLO *et al.*, 2013; LOYSE *et al.*, 2013; TSENG *et al.*, 2015).

A AmB é um fármaco antifúngico pertencente à classe dos polienos, com efeito fungicida. O mecanismo de ação consiste na ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica gerando poros e, assim, interrompendo a integridade celular e induzindo estresse oxidativo no ambiente citoplasmático, consequentemente morte celular. Apesar da AmB ligar-se com maior avidéz em membranas fúngicas, porém existe uma grande semelhança entre o ergosterol da membrana fúngica e o colesterol da membrana de mamíferos o que causa graves quadros de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade quando administrado por longo período. Assim, formulações lipídicas (complexo lipídico/ABLC e lipossomal/L-AmB) são bem mais toleradas e apresentam menor toxicidade e efeitos adversos nos pacientes, principalmente aquele com predisposição e com disfunção renal (ANDERSON *et al.*, 2014; MESA-ARANGO *et al.*, 2014). Na forma lipossomal, é menos tóxica para os pacientes, mas apresenta custo que pode atingir 500.000 reais por paciente no Brasil e apenas a formulação convencional é disponibilizada pelo sistema público de saúde (BORBA *et al.*, 2018).

A 5-FC é um análogo da pirimidina fluorada com atividade fungistática, que interfere com o metabolismo da pirimidina, RNA/DNA e síntese proteica. O mecanismo de ação do 5-FC é a desaminação pela enzima fúngica citosina desaminase em 5-fluorouracil (5-FU), que então atua por duas vias: 5-FU pode ser convertido por enzimas celulares de processamento de pirimidina em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, que inibe a timidilato sintetase e bloqueia a síntese de DNA; ou pode ser convertido em trifosfato de 5-fluorouridina, que é incorporado ao RNA, interrompendo assim a síntese de proteínas e levando à parada do crescimento (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Após o tratamento de ataque, a terapia segue com a administração de fármacos da classe dos azóis, sendo o uso do fluconazol (400- 800 mg/Kg/dia) o fármaco de escolha, por um período de oito semanas. Em seguida, inicia-se a terapia de manutenção com FLZ em doses menores (200 – 400 mg/Kg/dia) por seis a doze meses (PERFECT *et al.*, 2010; GULLO *et al.*, 2013; LOYSE *et al.*, 2013; TSENG *et al.*, 2015).

Em casos de tratamento de meningite, a alternativa de substituição para o fluconazol, em, é a administração de voriconazol, que apresenta eficiência no combate a proliferação fúngica e atinge o nível terapêutico adequado no líquido cefalorraquidiano (PERFECT *et al.*, 2010; GULLO *et al.*, 2013). O mecanismo de ação dos azóis consiste na inibição da enzima do citocromo P450, a lanosterol 14- α desmetilase. Esta enzima é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol na membrana fúngica e uma vez inibida, compromete a biossíntese de ergosterol, levando ao acúmulo de componentes esteróides tóxicos e consequentemente a inibição crescimento fúngico (GULLO *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2017).

Azólicos de amplo espectro (posaconazol e voriconazol) podem ser úteis em casos de recaída, enquanto que as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) não apresentam atividade *in vivo* contra isolados de *Cryptococcus* (PERFECT *et al.*, 2010).

2.6 Resistência *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos

A resistência aos antimicrobianos é uma crescente problema em doenças infecciosas, e a criptococose não é exceção. Embora a resistência ambiental seja rara, resistência adquirida foi observada com todos os três classes de antifúngicos em uso contra *Cryptococcus* spp. (MAY *et al.*, 2016; BONGOMIN *et al.*, 2018; SPADARI *et al.*, 2020).

Nos antifúngicos poliênicos, a resistência ainda é bastante rara na clínica. O mecanismo de resistência AmB em isolado de *C. neoformans* resulta de mutações no ERG2, esterol $\Delta 8-7$ isomerase, uma enzima localizada na biossíntese de ergosterol, correlacionada com redução de ergosterol e consequentemente a resistência (KELLY *et al.*, 1994). No entanto, AmB sem alterações significativas na biossíntese de ergosterol foram relatados em *C. neoformans*, sugerindo que mecanismos independentes de esterol (JOSEPH-HORNE *et al.*, 1996).

Entretanto, mecanismos de resistência a AmB em outros gêneros são bem relatados *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp., que comumente sugerem mutações genéticas na biossíntese de ergosterol para causar diminuição do teor de ergosterol e induzir a substituição por precursores biossintéticos, incluindo lichesterol, lansosterol e fecosterol (SANGLARD *et al.*, 2003; BHATTACHARYA *et al.*, 2018).

Os azóis são uma classe antifúngica amplamente utilizada na clínica, com a vasta atividade contra a as espécies, perfil de segurança e disponibilidade em formulações orais, intravenosas e tópicas. Consequentemente, a resistência a esses fármacos, vem sendo cada vez mais relatada (BONGOMIN *et al.*, 2018). Os mecanismos de resistência aos azóis incluem mutações em ERG11, resultando em superexpressão ou síntese reduzida de ergosterol e / ou superexpressão das bombas de efluxo *PDR11*, *AFR1*, *AFR2* e / ou *MDR1* (BONGOMIN *et al.*, 2018, BASTOS *et al.*, 2018, CHANG *et al.*, 2018).

Dentre a resistência aos azóis, estudos sugerem que a resistência ao fluconazol é relativamente comum em recidivas de meningite criptocócica (BONGOMIN *et al.*, 2018). O fenótipo FLZ-resistente foi associado a duas mutações pontuais no gene ERG11 que são responsáveis pelas substituições de aminoácidos G470R (GAGO *et al.*, 2017) e G484S (RODERO *et al.*, 2003) em cepas de *C. neoformans*. Essa mutação pontual identificada no

gene ERG11 de *C. neoformans* também está associada a resistência ao voriconazol (SIONOV *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram o papel das bombas de efluxo pela superexpressão dos dois transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC) *AFR1* e *MDR1* (BASTOS *et al.*, 2017; SANGUINETTI *et al.*, 2006; POSTERARO *et al.*, 2003).

Além disso, também já foi descrito que há um padrão de resposta celular diferente aos azólicos, denominado heteroresistência. Este fenômeno é caracterizado pelo surgimento de subpopulações resistentes a FLZ, a partir de uma linhagem sensível. Essas subpopulações se adaptam a concentrações superiores a concentração inibitória mínima e são capazes de reverterem à sensibilidade após serem cultivadas, repetidamente, em meios livres do fármaco. A heteroresistência em *C. neoformans* pode estar relacionada à duplicação cromossômica, relatados nos sorotipos, A e D, apresentaram duplicação cromossômica em resposta a pressão de FLZ (SIONOV *et al.*, 2013).

Outro fármaco, utilizado na terapia é a flucitosina tem um espectro estreito de atividade, é restrita a leveduras patogênicas como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (SILVA *et al.*, 2012; KATHIRAVAN *et al.*, 2012). A resistência é comumente relatada, vários mecanismos de resistência são descritos devido aos múltiplos passos enzimáticos intracelulares requeridos para a sua ação, como alterações nas enzimas alvo, UMP pirofosforilase, citosina permease e citosina desaminase, ou aumento da produção de pirimidinas (FUENTEFRÍA *et al.*, 2018; CAMPOY; ADRIÓ, 2017).

Com o aumento da criptococose e uso de medicamentos antifúngicos, o número de relatos de resistência aos também aumentou, o que evidencia ainda mais a necessidade no desenvolvimento de novas terapias antifúngicos.

2.7 Derivados de acetanilidas

A identificação de substâncias inovadoras com atividade antimicrobiana é extrema relevância, devido aumento de morbimortalidade, ao uso indiscriminado de antimicrobianos, e consequentemente o número de micro-organismos resistentes e/ou multirresistentes ao tratamento e as propriedades farmacocinéticas dos fármacos (DE AZAMBUJA *et al.*, 2018; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A busca por novos alvos e terapias anti-criptocócicas vêm sendo objeto de estudo de diversas pesquisas ao longo dos últimos anos, os produtos naturais e seus derivados, têm sido utilizados devido à grande diversidade de substâncias com atividade biológica (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).

O grupo amida é amplamente encontrado em compostos criados pelo homem e presentes na natureza e apresenta propriedades biológicas importantes (RUIDER; MAULIDE, 2015). De acordo, com Aschale(2012), o interesse em fazer substituições nos derivados de acetanilida devido a este grupo estar presente em várias drogas sintéticas relacionadas a uma ampla gama de atividades biológicas. Estudos demonstram que estes derivados possuem ação antifúngica (BARDIOT *et al.*, 2015), antibacteriana (ADDLA *et al.*, 2014), antiviral, anti-helmíntica, analgésica e anti-inflamatório (ASCHALE, 2012), inseticida (WAN *et al.*, 2011) e anticonvulsivante (ALI *et al.*, 2015).

Entre os derivados de acetanilida halogenados, destaca-se as cloroacetamidas que estão entre os herbicidas mais utilizados no mundo (KATKE *et al.*, 2011; KARIER *et al.*, 2017). Sua ação ocorre na membrana plasmática dos vegetais através da inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (ECKERMANN *et al.*, 2003). Além disso, estudos demonstram que esses compostos e seus derivados apresentam ação biológica comprovada, como ação antibacteriana (KATKE *et al.*, 2011; ASCHALE, 2012), antileishmania (LAVORATO *et al.*, 2017) e entre outras atividades.

A ação antifúngica das cloroacetamidas também foram reportadas por Katke *et al.* (2011) e Aschale (2012), através do perfil de suscetibilidade de cepas de *Candida* spp., *A. niger* e *F. oxysporum* com o método de disco difusão em ágar. Além disso, Machado *et al.* (2019) avaliaram a ação antifúngica de derivados de cloroacetamidas frente a cepas dermatofíticas, *Fusarium* spp. e verificaram ação fungicida e fungistática para *Candida* spp.

A prospecção por novas entidades químicas eficazes no combate à resistência fúngica e seguras ao paciente são os principais objetivos no rastreamento de novas entidades com potencial antifúngico. A escolha por uma classe de compostos sintéticos para o rastreamento de atividade biológica pode ser baseada em relatos da literatura que comprovam que compostos derivados de determinada classe apresentam eficácia sobre algum microrganismo. Neste contexto, pela falta de estudos envolvendo o potencial ação antifúngica de outros derivados halogenados como bromoacetamidas, demonstra o interesse de promover pesquisas, a fim de elucidar sua provável ação antifúngica em cepas *Cryptococcus neoformans* e ampliar os conhecimentos biológicos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme do 2-bromo-*N*-fenilacetamida sobre linhagens de *Cryptococcus neoformans*, como também o estudo toxicidade *in silico* e *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do 2-bromo-*N*-fenilacetamida e antifúngicos padrões;
- Analisar a ação do 2-bromo-*N*-fenilacetamida sobre a parede celular fúngica;
- Verificar a ação do 2-bromo-*N*-fenilacetamida sobre a membrana celular fúngica, a partir da sua capacidade de interagir com o ergosterol presentes na membrana celular das linhagens *Cryptococcus neoformans* em estudo;
- Estudar a interação do 2-bromo-*N*-fenilacetamida em enzimas alvos para fármacos antifúngicos, através do estudo de docking molecular;
- Verificar a influência do 2-bromo-*N*-fenilacetamida e antifúngicos padrões no biofilme;
- Avaliar a interferência do 2-bromo-*N*-fenilacetamida sobre efeitos dos antifúngicos padrões e estudo de associação;
- Determinar os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos do 2-bromo-*N*-fenilacetamida *in silico*;
- Estudar o efeito do 2-bromo-*N*-fenilacetamida em eritrócitos humanos, por meio da avaliação do potencial hemolítico e da fragilidade osmótica.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

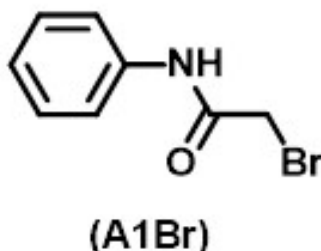
4.1 Local da pesquisa

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os ensaios toxicológicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) / Patos PB, sob coordenação do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

4.2 Substância - teste

Para a avaliação da atividade antifúngica foi utilizada como produto-teste a amida sintética 2-bromo-*N*-fenilcetamida (Figura 5), que será referida nos tópicos subsequentes como A1Br, cuja síntese foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba, pelo Dr. Helivaldo Diógenes da Silva Souza, sob a supervisão do Professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho. A solução A1Br foi preparada no momento de execução dos testes, sendo devidamente solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e tween 80 a 2%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3mL) para obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

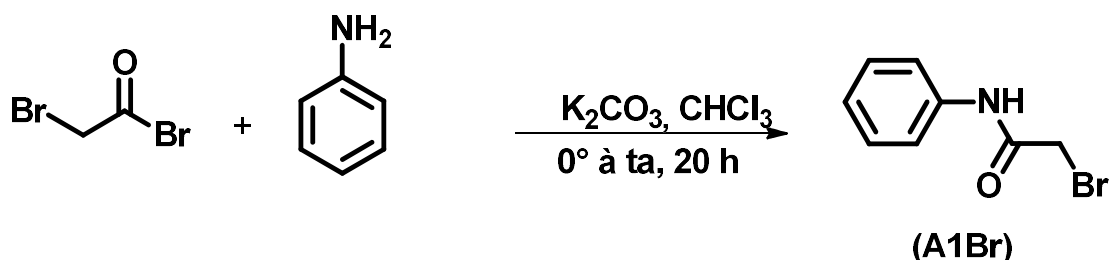
Figura 5. Estrutura química da amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida.



4.2.1 Preparação 2-bromo-*N*-fenilacetamida

Num balão de 50 mL contendo anilina (1,86 g; 0,020 mols) e K_2CO_3 (3,31 g; 0,024 mols) solubilizado em 20 mL de $CHCl_3$ a uma temperatura de $0^\circ C$, foi adicionado lentamente o bromo de 2-bromoacetila (4,84 g; 0,024 mols). O banho de gelo foi retirado e a reação fica sobre agitação por 20 horas em temperatura ambiente. A mistura reacional foi acompanhada por TLC (hexano/acetato de etila 1:1). Ao término da reação, a mistura reacional foi submetida a uma extração. A fase orgânica foi lavada com água (3 x 25 mL), seca no sulfato de sódio anidro e depois concentrada à uma pressão reduzida, fornecendo o um precipitado que foi recristalizado numa mistura etanol/água fornecendo 80% de rendimento.

Figura 6. Representação da preparação 2-bromo-*N*-fenilacetamida.



2-bromo-*N*-fenilacetamida (A1Br): Rendimento: 80%, p.f. $130-132^\circ C$ (Lit. $129-131^\circ$). RMN 1H (400 MHz – $CDCl_3$): δ 4.02 (s, 2H, CH_2), 7.17 (ddd, $J = 8.6, 2.2, 1.1$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.39 – 7.32 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.53 (dd, $J = 8.6, 1.0$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.13 (s, 1H, NH). IV (ATR): ν/cm^{-1} 3294 (NH), 3145, 3037 (CH_{Ar}), 1654 (C = O), 1606, 1498, 1444 (C=C $_{Ar}$), 1111 (C – Br), 758 (CH_{Ar}).

O composto foi caracterizado e os dados corroborando com Xie *et al.* (2014).

4.2.2 Análise de identificação estrutural e pureza

Todos os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais com grau P.A. Os que não apresentavam a qualidade adequada, quando necessário, foram purificados.

A purificação do composto foi realizada pela técnica de recristalização em etanol/água e confirmada a partir da determinação da faixa de fusão obtido em placa de aquecimento da marca MQAPF-301 (Microquímica) e a identificação estrutural foi evidenciada por análises espectrométricas de absorção do Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio¹ e Carbono¹³.

4.2.2.1 Infravermelho

O espectro na região de Infravermelho (IV) (Anexo A) foi obtido no espectrômetro FTIR modelo IRPrestige-21, do fabricante Shimadzu, com acessório de reflectância total atenuada (do inglês, ATR) acoplado, com as seguintes condições de análise: Região 4000-600 cm^{-1} ; Resolução: 4 cm^{-1} ; N° acumulações: 20; Modo: transmitância.

4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear – Hidrogênio¹ e Carbono ¹³

O espectro de RMN ¹H e RMN ¹³C (Anexo A) foram obtidos no aparelho da Marca Bruker, operando respectivamente, a 400 MHz e 101 MHz. Tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em unidades de parte por milhão (ppm). As multiplicidades das bandas foram indicadas segundo as convenções: s – singlete, d – dubleto, dd – duplo dupleto, duplo duplo dupleto – ddd e m – multiplete.

4.3 Produtos - controle

Os produtos utilizados como controles na execução das metodologias, foram os seguintes antifúngicos sintéticos: anfotericina B e voriconazol, fármacos utilizados para o tratamento de infecções por *Cryptococcus neoformans*, adquiridos da Sigma-Aldrich® e disponíveis no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas no Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal da Paraíba. As soluções também foram preparadas no momento de execução dos testes.

4.4 Linhagens fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 18 linhagens de origem clínica de *Cryptococcus neoformans* (LM-22, LM-49, LM-108, LM-120, LM-230, LM-258, LM-260, LM-287, LM-300, LM-309; LM-525, LM-528, LM-820, LM-1147, LM-1401, LM-1801, LM-1907, LM-2601) obtidas da coleção do Laboratório de Micologia Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. A linhagem padrão INCQS 40221 foi adquirida da Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Todas as linhagens fúngicas foram mantidas em tubo de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO Laboratories Ltda.), a uma temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em Ágar Sabouraud Dextrose incubados a 35 °C.

4.5 Meios de cultura

Para manutenção das linhagens fúngicas selecionadas e realização dos ensaios de atividade antifúngica foram utilizados Ágar Sabouraud Dextrose e meio líquido RPMI 1640-L-glutamina (*Roswell Park Memorial Institute*) ambos adquiridos da DIFCO (DIFCO Laboratories Ltda, USA), os quais foram preparados conforme instruções do fabricante. Antes de sua utilização, os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.6 Inóculo

A preparação do inóculo foi realizada a partir de culturas recentes de cada uma das 18 linhagens selecionadas de *C. neoformans*, previamente cultivadas em tubos estéreis contendo ASD inclinado e incubados a 35°C por 24- 72 horas para atingirem crescimento satisfatório. Para o preparo da suspensão das linhagens, as colônias fúngicas recentes foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) e, por meio de suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de platina em “L”, as suspensões foram obtidas. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex (FANEM), comparando-se e ajustando-se, posteriormente, sua turbidez com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Por fim, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões serão ajustadas no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente 1×10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACECK; GREEGER, 2000; ABERKUME *et al.*, 2002; ANTUNES *et al.*, 2006; CLSI, 2008; FREIRE *et al.*, 2014, CLSI, 2015).

4.7 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos estabelecidos por Cleeland e Squires (1991), Hadacek e Greger (2000) e CLSI (2008).

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se A1Br. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 orifícios estéreis e com tampa (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do meio líquido RPMI 1640 duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da solução do produto-teste na concentração inicial de 1024 µg/mL (também duplamente concentrados), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015 e 0,007 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontre-se a maior concentração e, na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados nas cavidades 10 µL do inóculo, de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, das linhagens fúngicas, correspondendo cada coluna da placa a uma linhagem.

Para verificar a ausência de interferência dos solventes DMSO e Tween 80, a serem utilizados na preparação da solução do A1Br, sobre os resultados, foi realizado um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do RPMI 1640 duplamente concentrado, DMSO (até 10%), Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão fúngica. Além disso, um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do RPMI 1640 duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada linhagem. Também foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foram colocados 200 µL do RPMI 1640 em um orifício, na ausência da suspensão dos fungos.

Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado para os antifúngicos padrões Anfotericina B e Voriconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 72 horas (SAHIN *et al.*, 2004), para realização da leitura. As CIM's para A1Br e os antifúngicos foram definidas como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios (SANTOS; HAMDAN, 2005). Os resultados foram expressos em CIM₅₀ e CIM₉₀, correspondentes às concentrações em que cada produto inibiu 50% e 90% das linhagens ensaiadas, respectivamente.

A atividade biológica do produto foi interpretada, através de sua CIM, conforme os seguintes critérios: 50-100 µg/mL = atividade excelente/ótima; 100-500 µg/mL = atividade

moderada; 500-1000 µg/mL = baixa atividade; maior que 1000 µg/mL = produto inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007).

4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima foi determinada para as 18 linhagens de *Cryptococcus neoformans*. Após a leitura da CIM, alíquotas de 10 µL da menor concentração com capacidade de inibir o crescimento dos fungos, além das três concentrações imediatamente superiores, foram retiradas das cavidades da placa de microdiluição para serem semeadas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose. O sistema foi incubado a 35°C por 72 horas. A CFM foi definida como a menor concentração de A1Br testado, semeada em ASD, na qual não haja crescimento ou o crescimento seja inferior a 3 UFCs (ALBERKUME *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2011). Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado para anfotericina B e voriconazol.

4.7.3 Ação do A1Br na parede celular fúngica: Ensaio com sorbitol

O sorbitol é um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Este ensaio foi utilizado para verificar se o A1Br apresenta ação antifúngica por atuar na parede celular fúngica.

Para este experimento foram selecionadas aleatoriamente as cepas *Cryptococcus neoformans* INCQS-40221 e LM 22, e determinada a CIM da substância, na presença do sorbitol, de acordo com o protocolo descrito no item 4.7.1. Neste caso, foi utilizado meio de cultura previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17) a 0,8 M. Os valores de CIM de A1Br foram então comparados na ausência e presença de sorbitol. Os ensaios foram realizados em triplicata e resultado expresso pela média aritmética (FROST *et al.*, 1995; ESCALANTE *et al.*, 2008).

4.7.4 Ação do A1Br na membrana celular: Interação com ergosterol

A determinação da CIM do A1Br, contra as linhagens de fúngicas *Cryptococcus neoformans* INCQS-40221 e LM 22 foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U”, de forma semelhante protocolo exposto na determinação da CIM, item 4.7.1. Neste caso, especificamente, foi

utilizado meio de cultura previamente adicionado de 400 µg/mL de ergosterol. Os valores de CIM dos produtos foram então comparados na ausência e presença de ergosterol exógeno. Foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, cujo mecanismo de ação envolve a interação com ergosterol da membrana, para servir como controle positivo dos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 37°C por 72 horas para realização da leitura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética (ESCALANTE *et al.*, 2008).

4.7.5 Potencial de inibição do A1Br na formação do biofilme

Para o ensaio de inibição de formação de biofilme, 10 µL de cada suspensão de células fúngicas *Cryptococcus neoformans* (INCQS-40221, LM 22 e LM 525) foram dispensados em placas de microtitulação com 100 µL de meio RPMI contendo diferentes concentrações de A1Br ($\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, MIC x 2, MIC x 4) em cada poço. Após 48 h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, o conteúdo dos poços foi descartado e lavado com água destilada estéril para remoção do crescimento planctônico. Após secagem à temperatura ambiente, 140 µL de solução de cristal violeta a 1% (NEWPROV®) foram adicionados ao longo de 40 min. O corante foi descartado e seu excesso nas paredes do tubo foi removido por lavagem com água destilada. Após a secagem, foram incubados com 140µL de etanol absoluto (RIOQUÍMICA®) por 15 minutos, medido em leitor de microplacas Multiskan GO a 595 nm. O controle negativo foi realizado contendo apenas meio de cultura e inóculo. As análises foram realizadas em triplicata. Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Balasubramanian *et al.* (2012), com modificações.

4.8 Análise da associação de A1Br sobre o efeito dos antifúngicos padrões

A substância-teste e os antifúngicos foram solubilizados, sendo preparadas diluições em concentrações dobradas (2048 e 1024 µg/mL, respectivamente), em relação à concentração inicial definida, e volumes de 100 µL serão diluídos seriadamente 1:2 em RPMI. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura terá 10 % da suspensão fúngica que foi previamente preparada como descrito no item 4.6. Cada microplaca estéril foi preenchida no sentido vertical e horizontal com a substância-teste e um antifúngico por vez para a obtenção do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (índice CIF). As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 72 horas.

O índice CIF foi calculado através da soma do CIFA + CIFB, onde A representa o antifúngico e B o composto em teste. O CIFA, por sua vez, foi calculado pela relação CIMA combinado/ CIMA sozinho, enquanto que o CIFB = CIMB combinado/ CIMB sozinho. Este índice foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo ($< 0,5$), aditividade ($0,5 - 1,0$), indiferença ($>1,0$) ou antagonismo ($>4,0$) (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991).

4.9 Ensaios *in silico*

4.9.1 *Pass online*

O potencial biológico do A1Br como agente antimicrobiano foi avaliado pelo software PASS online (www.way2drug.com/passonline) (KHURANA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2018; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2020). Este programa assume as atividades biológicas de moléculas orgânicas, utilizando a relação estrutura-atividade. As atividades biológicas encontradas estão relacionadas às interações de compostos com entidades biológicas. A previsão é analisada obtendo os índices Pa e Pi e categorizando se uma substância tem probabilidade de ser ativa ou inativa, respectivamente (KHURANA *et al.*, 2011; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2020).

4.9.2 *Molinspiration*

O software Molinspiration Molecule Viewer (www.molinspiration.com) permite a percepção de moléculas usando estatísticas Bayesianas sofisticadas, que combinam as estruturas e propriedades do composto ativo representativo no alvo específico com as estruturas de moléculas inativas, para reconhecer características da típica subestrutura da molécula ativa (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; GUPTA; ANIYERY; PATHAK, 2017).

A previsão do software é capaz de reportar parâmetros físico-químicos importantes na previsão da biodisponibilidade oral teórica. Além disso, para verificar se o composto pode ser planejado para administração oral, foi utilizada a "Regra dos Cinco", conforme descrito por Lipinski (2004). Nessa regra, se a molécula possui pontuação de pelo menos 3 parâmetros que atendam aos requisitos: área de superfície polar total -TPSA $<140 \text{ \AA}^2$; peso molecular - MW <500 daltons; um certo número de doadores de hidrogênio -nDLH ≤ 5 ; coeficiente de partição (água / óleo) - cLogP ≤ 5 , número de aceptadores de hidrogênio - nALH ≤ 10), o composto teoricamente terá boa biodisponibilidade oral (URSU; OPREA, 2010; URSU *et al.*, 2011).

4.9.3 Osiris

Para a análise dos parâmetros teóricos farmacocinéticos e toxicológicos do A1Br, essa ferramenta online (www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html) foi usada para predição por meio da comparação da estrutura química com fragmentos moleculares encontrados em um banco de dados (ABREU *et al.*, 2013).

Após análise, o software forneceu o potencial de semelhança e escore de drogas relacionados aos descritores topológicos, além de uma análise teórica dos efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e reprodutivos. Nesta análise, os resultados foram classificados como toxicidade ausente, toxicidade moderada e toxicidade grave (URSU; OPREA, 2010; URSU *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2018).

4.9.4 Docking Molecular

As enzimas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) juntamente com seus inibidores co-cristalizados, sob PDB ID: 3SFY (2.1 Å), 6ISJ (2.3 Å) e 6TZ8 (3.3 Å). A geometria da molécula foi otimizada utilizando o programa Hyperchem v. 8.0.3, através do método da mecânica molecular (MM+) e o método semi-empírico AM1 (Austin Modelo 1) (DEWAR; AMI, 1985). Para a realização das análises do docking molecular foi utilizado o software Molegro Virtual Docker (MVD) (v 6.0.1, Molegro ApS, Aarhus, Denmark) e utilizados os parâmetros padrões do software, retiradas as moléculas de água e gerado template no ligante PDB cristalizado na enzima.

4.10 Avaliação do efeito do A1Br em eritrócitos humanos

As amostras de sangue foram coletadas de adultos jovens saudáveis do tipo (A, B e O) de acordo com o Código de Ética da Associação Médica Mundial e após aprovação do comitê de ética (Parecer Número: 3.621.284) (Anexo B).

4.10.1 Potencial hemolítico

As amostras de eritrócitos de doadores de sangue humano foram diluídas em NaCl 0,9% na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos para obtenção da suspensão sem leucócitos e plaquetas 0,5%. Posteriormente, a substância A1Br foi adicionada às suspensões de hemácias, nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 µg/mL.

Para os controles, foi realizada uma suspensão de eritrócitos sem tratamento que corresponde a 0% de hemólise como controle negativo e uma suspensão de eritrócitos tratada com Triton X-100 1% correspondendo a uma hemólise de 100% como controle positivo.

As amostras foram incubadas por 1 hora a 22 ± 2 °C com agitação lenta e constante a 100 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem que representa a média aritmética.

4.10.2 Fragilidade osmótica

O ensaio de fragilidade osmótica eritrocitária foi realizado utilizando suspensões de hemácias a 0,5%. As concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL) da substância A1Br foram utilizadas para o tratamento de suspensões de hemácias a 0,5% por 1 h a 22 ± 2 ° C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram ressuspensos em solução hipotônica de cloreto de sódio 0,24% por uma hora a 22 ± 2 ° C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e a hemólise do sobrenadante foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm (DACIE; LEWIS 2001). Para os controles foi realizada suspensão de eritrócitos sem tratamento, que corresponde a 0% de hemólise como controle negativo e solução hipotônica de 0,24% de cloreto de sódio, correspondendo a 100% de hemólise como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem que representa a média aritmética.

4.11 Análise de dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e para determinar as diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados foi utilizada a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram plotados usando GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A diferença estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$, representados por asteriscos nas figuras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO



Online ISSN: 2455-3891

Print ISSN: 0974-2441

ICV 2019: 133.59

5.1 Antifungal and Antibiofilm activity of 2-bromo-N-phenylacetamide against *Cryptococcus neoformans*

Artigo aceito para publicação *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*

Antifungal and Antibiofilm activity of 2-bromo-*N*-phenylacetamide against *Cryptococcus neoformans*

Thamara Rodrigues de Melo^{1*}, Laísa Vilar Cordeiro¹, Helivaldo Diogenes da Silva Souza², Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho², Abrahão Alves de Oliveira-Filho³, Sávio Benvindo Ferreira⁴, Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil;

²Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

³Federal University of Campina Grande, Patos, Brazil;

⁴Federal University of Campina Grande, Cajazeiras, Brazil;

*Email: th.rmelo@outlook.com;

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the antifungal and antibiofilm of 2-bromo-*N*-phenylcetamide (A1Br) against *C. neoformans* *in vitro*.

Methods: The compound was characterized by infrared (IR) and ¹H ¹³C- nuclear magnetic resonance spectrometry data. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the plate-dilution method and biofilm formation inhibition the *crystal violet* assay.

Results: A1Br inhibited the growth of *C. neoformans* with MIC of 0.25 and 0.5 µg/ml, and has good antibiofilm activity MIC x4, with ≥80% inhibition growth.

Conclusion: Thus, A1Br shows potential antifungal and anti-biofilm agents for the treatment of infections caused by *C. neoformans*, as well as the eradication of cryptococcal colonization of medical prosthetic devices.

Keywords: Antifungal; biofilm; 2-bromo-*N*-phenylcetamide, *Cryptococcus neoformans*, *in vitro*.

INTRODUCTION

Cryptococcosis is a predominantly opportunistic fungal infection caused by yeasts of the *Cryptococcus* genus, belonging to the *C. gattii* and *C. neoformans* complexes. This disease is associated with one of the main causes of mortality in immunocompromised individuals, predominantly HIV/AIDS [1,2,3].

Infection occurs through inhalation of the yeast's infectious forms, the basidiospores, usually in soil contaminated with decomposing bird and vegetable excrement. As a result, the manifestations usually occur in the pulmonary and cerebral form, often causing the most severe state of the disease, meningocephalitis [4].

The pathogenicity of species of the genus *Cryptococcus* is facilitated by the expression of several virulence factors that play an important role in the colonization, adhesion, invasion, dissemination and evasion of the fungus from the defense mechanisms of the host's immune system [5]. Among these factors are the ability to adhere to host cells and/or medical devices, production of exoenzymes and biofilm formation [5, 6,7,8].

Biofilms are defined as communities of highly organized microorganisms involved in a matrix polymeric, which are composed mainly of DNA, proteins and polysaccharides [9].

Biofilm formation is an important virulence factor and is associated with increased antifungal resistance as it makes it harder for antifungal agents to penetrate the extracellular matrix, in addition to protecting the fungal cells from the host's immune response and environmental stress [10,11]. The eradication of biofilms *in vivo* generally requires concentrations of antimicrobials that are generally toxic to the host. In *Cryptococcus neoformans*, biofilms are more resistive than planktonic cells in relation to amphotericin B, in addition to being generally resistant to fluconazole and voriconazole [12]. In order to reverse this scenario, several studies have been carried out to screen for new compounds that have antifungal activity.

The amide group is widely found in natural and synthetic products and important biological properties are described. Among the amides, some studies verified the efficacy of acetanilide derivatives, related to a wide range of biological activities, such as anti-inflammatory [13,14], analgesic [13,15], antibacterial [13,16,17], antiparasitic [13,18,19] and antifungal [13,16].

Considering, *C. neoformans* biofilm infections are increasingly recognized as a clinical problem. The discovery of new chemical entities effective in combating fungal resistance and with low toxicity is necessary and urgent. The aim of this work is to investigate antifungal activity

and the ability of 2-bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br) to interfere in the inhibition of biofilm formation in *Cryptococcus neoformans* isolates.

MATERIALS AND METHODS

Test Substance and Antifungal Drugs

Aniline, bromoacetyl bromide, potassium carbonate (K_2CO_3), chloroform and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The substance A1Br was prepared in a 50 mL flask containing aniline (1.86 g; 0.020 moles) and K_2CO_3 (3.31 g; 0.024 moles) solubilized in 20 ml of $CHCl_3$ at a temperature of 0 ° C, is 2-bromoacetyl bromine (4.84 g; 0.024 moles) is added slowly. The bath ice is removed and the reaction is stirred for 20 hours at room temperature environment. The reaction mixture is accompanied by TLC (1: 1 hexane / ethyl acetate).

At the end of the reaction, the reaction mixture was subjected to extraction. The phase organic is washed with water (3 x 25 ml), dried over anhydrous sodium sulfate and then concentrated at a reduced pressure, providing the precipitate that was recrystallized in an ethanol /water (8:2) mixture providing 80 % yield. The A1Br compound was characterized by 1H -nuclear magnetic resonance spectrometry data and infrared (IR) and the data corroborated with Xie *et al.* [20].

Voriconazole and amphotericin B (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil) were dissolved in 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 2% Tween 80 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil), and using sterile distilled water.

Culture, Microorganisms and Inoculum Preparation

Strains of *C. neoformans* clinical (LM-22 and LM-525) and standard origin INCQS 40221(National Institute of Quality Control in Health) were used.

The strains were kept on Sabouraud dextrose agar (SDA) at 4°C until the inoculum was prepared. The preparation of the inoculum was carried out in inclined sterile tubes containing SDA and incubated at $35^\circ \pm 2^\circ$ C for 72 hours. After the incubation period, a fungal suspension was prepared and adjusted on the 0.5 Mc Farland scale.

To test the inhibition of biofilm formation, the culture medium RPMI-1640-L-glutamine (without sodium bicarbonate) was used (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil).

Determination of Minimum inhibitory concentration (MIC)

MIC was performed using the broth microdilution technique [21, 22, 23]. Briefly, 100 μ l of RPMI-1640 doubly concentrated were distributed to the microdilution plate wells. Then, 100 μ l of A1Br (also doubly concentrated) was dispensed in serial dilution in initial concentrations of 1024 μ g/ml to 0.007 μ g/ml. Then, 10 μ l aliquots of the inoculum suspension of the strain were added to the wells. At the same time, sterility control and negative control were performed. The plates were incubated at 35 ± 2 ° C for 72 hours. The results were analyzed observing the turbidity of the medium that is indicative of the growth of the microorganism. MIC is defined as the lowest concentration that produces visible inhibition of yeast growth compared to controls. They were expressed as the arithmetic mean of the MIC obtained, performed in triplicate.

A1Br antifungal activity was interpreted and considered active or inactive, according to the following criteria: strong activity: 50–500 μ g/ml; moderate activity: 600–1500 μ g/ml; weak or inactive activity: > above 1500 μ g/ml [24].

Biofilm formation inhibition assay

In the biofilm inhibition assay, 10 μ l of *Cryptococcus neoformans* fungal cell suspension was dispensed on microtiter plates with 100 μ l of RPMI medium containing different concentrations of A1Br ($\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, MIC x 2, MIC x 4) on each item. After 72 h of incubation at 35 ± 2 °C, the contents were discarded from the wells and washed with sterile distilled water. At room temperature, drying occurred and 140 μ l of 1% violet crystal solution (NEWPROV®) was added over 40 min. After discarding the dye and the excess is removed with distilled water. After drying, 140 μ L of absolute ethanol (RIOQUÍMICA®) was added for 15 minutes, measured in a Multiskan GO microplate reader at 595 nm. The negative control was performed. The analyzes were performed in triplicate. This test was performed according to the methodology described by Balasubramanian *et al.* [25], with modifications.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed to determine significant differences between the treated and untreated groups by unidirectional analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post-test. The results were plotted using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad

Software, La Jolla, CA, USA). The statistical difference was established at values of $p < 0.05$, represented by asterisks in the figures.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained for MICs of A1Br against *C. neoformans* were 0.25 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1). In view of this result, we can classify the substance as an optimal activity, since, according to Sartoratto *et al.* [24] the MIC results will be considered as: excellent activity if the value is 50-500 $\mu\text{g/ml}$; moderate: 600 - 1500 $\mu\text{g/ml}$; and weak or inactive activity when the value is above 1500 $\mu\text{g/ml}$.

Table 1. Minimal inhibitory concentration of the A1Br against of *Cryptococcus neoformans*.

Strains	Minimal inhibitory concentration	Control*
	MIC A1Br (mg/ml)	
INCQS 40221	0.5	+
LM-22	0.5	+
LM-525	0.25	+

MIC: Minimum inhibitory concentration; *Control of microbial growth

To date, this is the first study in the literature on the antifungal activity A1Br. However, there are studies with chloroacetamide derivatives, in which Katke *et al.* [26] evaluated the antimicrobial activity of these derivatives using the disk diffusion method and considered strong activity. Machado *et al.* [27] verified the antifungal activity of 11 chloroacetamide derivatives using MIC, only three were effective against dermatophytes (MIC: 3.12–50 $\mu\text{g/ml}$) and *Candida* species (MIC: 25–50 $\mu\text{g/ml}$).

The formation of biofilm represents a major problem in therapy, due to the concentration required to eliminate it, it may exceed permitted doses of the antimicrobial [28, 29].

The ability of A1Br to inhibit the biofilm formation of *C. neoformans in vitro* was evaluated. The A1Br molecule showed inhibition capacity at all concentrations tested. In the treated and control groups, significant differences were observed (Figure 1a, 1b, 1c). It was

observed in the graph that A1Br presents good antibiofilm activity [30] MIC x4, corresponds to an $\geq 80\%$ inhibition of biofilm growth in relation to the dose-dependent concentration, the higher the concentration the better inhibition capacity.

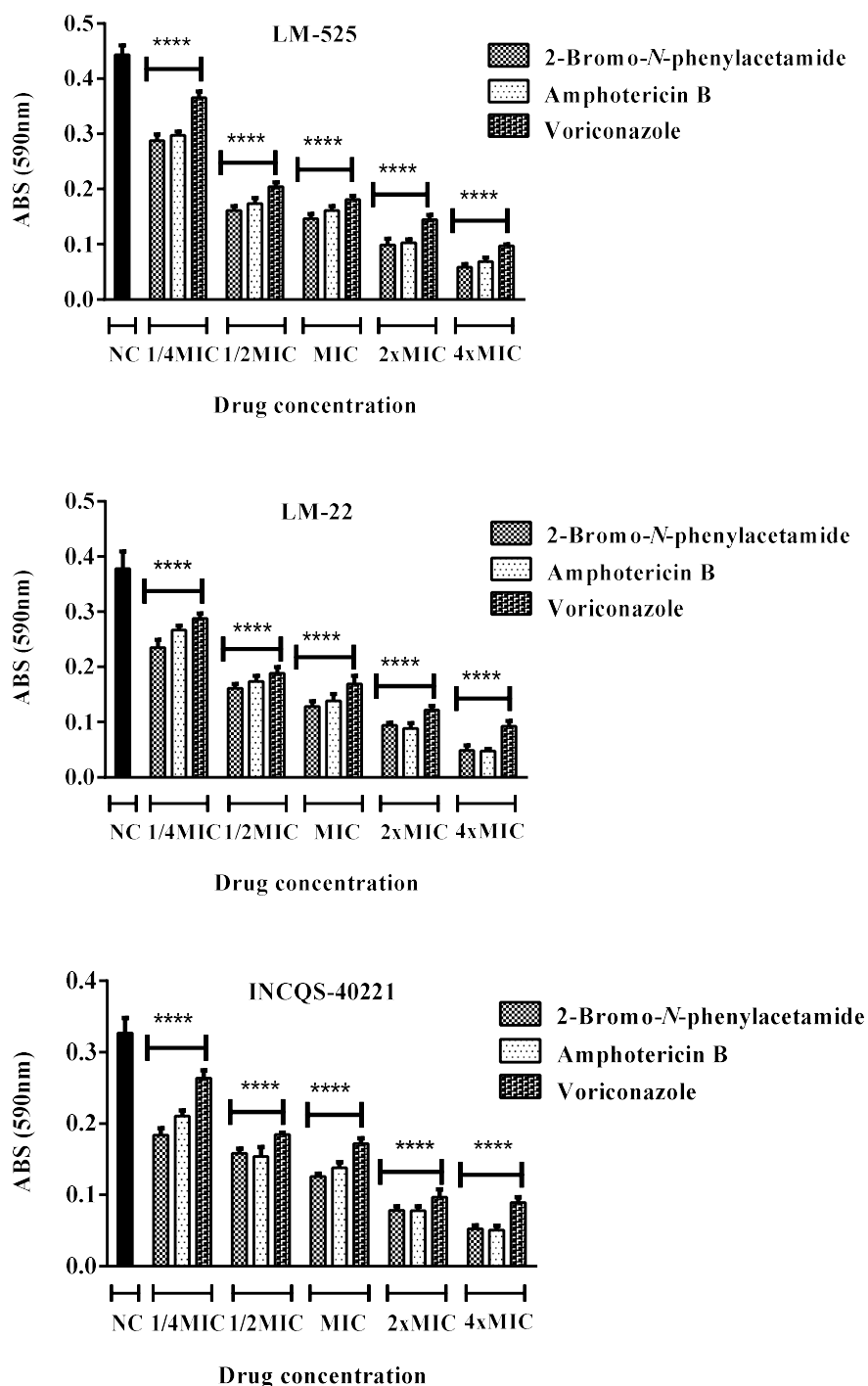


Figure 1. The effect of inhibiting biofilm formation was examined A1Br, amphotericin and voriconazole in concentrations ranging from 1/4 to 4x MIC using the crystal violet stain assay.

After 1/4 MIC, there was a reduction of more than 40% in the biofilm formation by *C. neoformans*. This study demonstrates sub-1/4 MIC of A1Br had better ability to inhibit biofilm

formation than voriconazole ($p \leq 0.0001$) (Figure 1a, 1b, 1c). However, this reduced action on the biofilm may be associated with protection of the exopolymeric matrix, composed mainly of glucuronoxylomannan in the biofilm cells, forming a physical barrier that makes it difficult for voriconazole to reach the cell [12,31]. In addition, other mechanisms such as increased gene expression and/or efflux pump activity in biofilm-forming cells, compared to planktonic antifungals, may be associated with this reduction

Amphotericin B and A1Br inhibited over 80% of all biofilms of *Cryptococcus neoformans* strains at concentrations ≥ 0.5 and $1 \mu\text{g/ml}$, respectively (Figure 2). In the study by Martinez and Casadevall [12] it was observed that the survival of biofilms was reduced by approximately 50% after treatment with $4 \mu\text{g/ml}$ of amphotericin B and 80% of biofilm *C. neoformans* were inhibited after treatment with $8 \mu\text{g/ml}$ of amphotericin B. Therefore, A1Br has shown very good antifungal and anti-biofilm activity against biofilm-forming *Cryptococcus neoformans*.

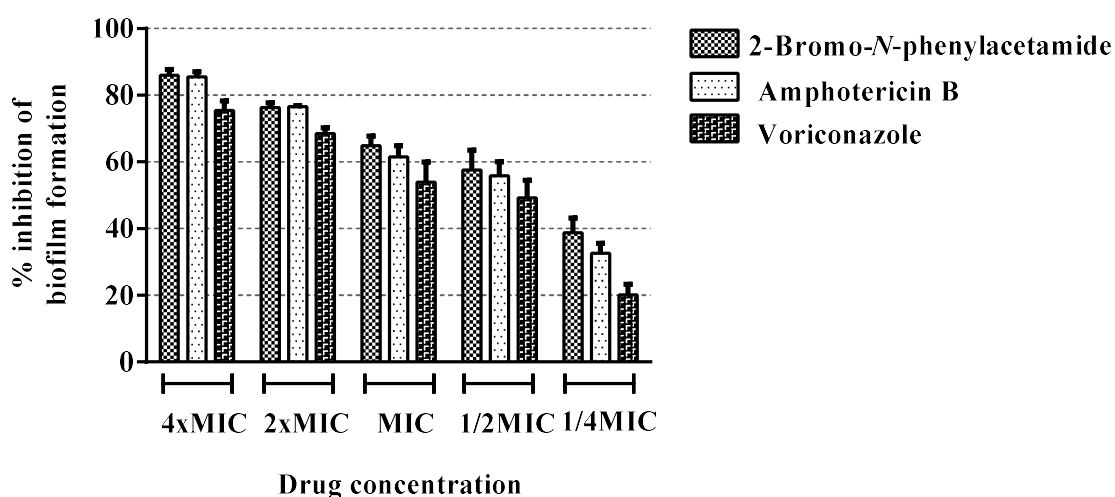


Figure 2. The percentage of inhibition of the biofilm formation of the strains was examined at final concentrations of A1Br ranging from 1/4 to 4 x MIC.

CONCLUSIONS

The search for medicinal chemical that exhibit antifungal and antibiofilm activities has been of interest since the rise of antimicrobial resistance. In this study, the antifungal and antibiofilm action of compound 2-bromo-*N*-phenylcetamide, can make it a promising new antifungal agent in the treatment of cryptococcosis. Additional studies are needed to elucidation of antibiofilm activity in the capsule and adhesion mechanism.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Thamara Melo, Laisa Cordeiro, Helivaldo Souza, Sávio Ferreira contributed in carrying out experiments, analyzing data and preparing the manuscript. Dra. Edeltrudes Lima, Dr. Abrahão Oliveira and Petrônio Athayde-Filho contributed in designing the experiment and put forwarded valuable suggestions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank for the support provided the Brazilian funding agency: CNPq and by the Federal University of Paraíba (UFPB).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Herkert PF, Hagen F, Pinheiro RL, Muro MD, Meis JF, Queiroz-Telles F. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(4):62.
2. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):179-206.
3. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(8):873-881.
4. Negróni R. Cryptococcosis. *Clin Dermatol*. 2012;30(6):599-609.
5. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):10-24.
6. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, Donati KGD, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J. Clin. Microbiol*. 2007;45(6):1843-1850.
7. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, Esterase and Hemolytic Activities of *Candida* spp. Isolated from Onychomycosis and Oral Lichen Planus Lesions. *J Mycol Med*. 2013; 23(2):113-118.
8. Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses*. 2014;57(1):1-11.
9. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: the microbial "protective clothing" in extreme environments. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(14):3423.
10. Santos ALS, De Mello TP, Ramos LS, Branquinha MH. Biofilm: A Robust and Efficient Barrier to Antifungal Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2015; 1:1.
11. De Mello TP, De Souza Ramos L, Braga-Silva LA, Branquinha MH, Dos Santos, ALS. Fungal Biofilm - A Real Obstacle against an Efficient Therapy: Lessons from *Candida*. *Curr Top Med Chem*, jan. 2017.

12. Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):1021-1033.
13. Aschale, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. *Int J Chemtech Res* 2012; 4:1437-1441.
14. Srikanth J, Sandeep T, Divya K, Govindarajan R. Screening of in vitro anti-inflammatory activity of some newly synthesized 1,3-thiazine derivatives. *Int J Pharm Chem Res* 2013; 3(2):213-220.
15. Verma AK, Martin A, Singh AK. Synthesis, Characterization and evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic activity of Benzothiazole derivatives. *Indian J. Pharm. Biol. Res.*, 2014; 2:84-89.
16. Pattan SR, Ali MS, Pattan JS, Purohit SS, Reddy VVK, Nataraj BR. Synthesis and microbiological evaluation of 2-acetanilido-4-arylthiazole derivatives. *Indian J. Chem.* 2006; 45:1929-1932.
17. Konda RK, Nuthakki VK, Nagarjuna R. Synthesis, characterization and pharmacological screening of substituted sulphonamide derivatives *Sch. Acad. J. Pharm.* 2014; 3:344-349.
18. Álvarez G, Varela J, Cruces E, Fernández M, Gabay M, Leal SM, Escobar P, Sanabria L, Serna E, Torres S, Figueredo Thiel S J, Yaluff G, Vera de Bilbao NI, Cerecetto H, González M. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1398-1404.
19. Brasil PF, de Freitas JA, Barreto ALS, Adade CM, Reis de Sá, LF, Constantino-Teles P, Toledo FT, de Sousa BA, Gonçalves AC, Romanos MTV, Comasseto JV, Dos Santos AA, Tassis AC, Souto-Padrón T, Soares RMA, Ferreira-Pereira A. Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Parasitol. Int.* 2017; 66:47–55.
20. Xie JL, Polvil EJ, Shekhar-Guturja, T, Cowen, LE. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiol.* 2014; 9:523-42.
21. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials vitro and experimental animal infection. In: LORIAN, V. (Ed.) *Antibiotics in laboratory medicine*. 3.ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, 1991. p.739-787.
22. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* 2000;11(3) 137-147.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts-Third Edition: Approved Standard M27-A3; 2008 a; 1.
24. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2004; 35(4) 275-280.
25. Balasubramanian D, Schnepel L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. *Plos one* 2012; 7:e34067.
26. Katke, SA.; Amrutkar, SV, Bhor RJ, Khairnar, MV. Synthesis of biologically active 2-chloro-*n*-alkyl/aryl acetamide derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2011; 2(7)148-156.
27. Machado GDRM, Fernandes SA, Pippi B, Bergamo VZ; Jacobus SB.; Lopes W, Lavorato, S. N.; Clemes IKG, Vainstein, MH.; Teixeira ML, Alves RJ, Fuentefria AM. Chloroacetamide derivatives as a promising topical treatment for fungal skin infections. *Mycologia* 2019; 111(4) 612-623.
28. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* 2013;8(10):1325–1337.

29. El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14:21.
30. Kwasny SM, Opperman TJ. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2010; 50:13A.8.1–13A.8.23.
31. Martinez LR, Casadevall A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Spectr.* 2015;3(3).



5.2 Pharmacological and Toxicological analysis of 2-bromo-*N*-phenylacetamide
Artigo submetido para publicação *Current Topics in Medicinal Chemistry*

Pharmacological and Toxicological analysis of 2-bromo-*N*-phenylacetamide

Thamara R. de Melo ^{*a}, Laísa V. Cordeiro ^a, Janiere P. de Sousa ^a, Sávio B. Ferreira ^c, Daniele de F. Silva ^a, Francisco P. de Andrade-Júnior ^a, Shellygton L. da Silva ^a, Aleson P. de Sousa ^a, Pedro Thiago R. de Figueiredo ^a, Rafael F. de Oliveira ^b, Helivaldo D. S. Souza ^b, Petrônio F. de Athayde-Filho^b, Abrahão A. de Oliveira- Filho ^d and Edeltrudes O. Lima ^a

^a*Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil;*

^b*Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;*

^c*Academic Life Sciences Unit, Teacher Training Center, Federal University of Campina Grande, Cajazeiras, Brazil;*

^d*Academic Unit of Biological Sciences, Health Center and Rural Technology, Federal University of Campina Grande, Patos, Brazil;*

Abstract

Introduction: Cryptococcal meningitis is an infection caused by encapsulated yeasts of the genus *Cryptococcus* that mainly affects immunosuppressed patients. Also, antifungal therapy presents difficulties regarding toxicity and drug-resistant pathogens. Thus, the development of new antifungal substances agents has been a promising alternative.

Objective: This paper aimed to investigate the antifungal activity of 2-bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br) *in silico*, *in vitro* against *C. neoformans* and *in vitro* toxicity.

Method: A1Br was synthesized and their structure characterized. *In silico* analysis, the software Pass online, Molinspiration, and Molecular docking were used. The antifungal evaluation using the broth microdilution technique and checkerboard method. The cytotoxicity A1Br tested against the erythrocytes of the ABO system.

Results: The substance was 410 biological activities and good oral bioavailability *in silico*. These results show that A1Br presented binding energy and favorable interactions for adequate anchoring in enzymes 6ISJ and 6TZ8, being a possible place of action for A1Br. The A1Br compound promoted an antifungal effect with minimum inhibitory concentration (MIC) 0.25 - 1 µg mL⁻¹ with fungicidal action. In investigating the mechanism of action, MIC was demonstrated in the presence of sorbitol that remained unchanged. In contrast, A1Br MIC increased in the presence of ergosterol, showing a

possible mechanism of action on the plasma membrane. The combinations of A1Br-amphotericin B and A1Br-voriconazole were antagonists. The analysis of cytotoxicity shows favorable.

Conclusion: Thus, A1Br shows promising antifungal activity through the interaction with fungal membrane ergosterol. However, more research must be conducted on its pharmacology and toxicity *in vivo*.

Keywords: 2-bromo-*N*-phenylcetamide, *in silico*, antifungal activity, mechanism of action, association study, *in vitro* toxicity.

1. INTRODUCTION

Cryptococcosis is a systemic fungal infection caused by encapsulated yeast through inhalation of basidiospores of pathogenic species of the genus *Cryptococcus*, with *C. neoformans* and *C. gattii* being the most frequent in the disease [1,2]. The growing number of immunocompromised individuals, cryptococcal meningitis, is the most worrying form of the disease resulting in 181,000 deaths in year [3].

The number of drugs for the therapy of cryptococcosis is reduced, with amphotericin B, 5-fluorocytosine, and fluconazole being used. However, the pharmacological choice depends on the patient's underlying disease, immunity, the site of infection, and antifungal toxicity [4,5].

The limited arsenal of antifungal drugs, the expansion of fungal resistance and side effects encourage researchers to look for new molecules [6-9]. In this context, amides are a class that has been found in abundance in nature as natural products [10,11] proteins and in biological and synthetic polymers[12]. They have already been described as an anti-inflammatory, analgesic, antitumor[13], antiparasitic[14,15], and antimicrobial [16,17]. Consequently, one of the families of synthetic amides has been described is acetanilide.

The potential of acetanilide derivatives has demonstrated biological activities, including anti-inflammatory [18], analgesic [19], antipyretic [19], antifungal [20], antibacterial [20,21], herbicides [22], hypoglycemic [23], antioxidant [24] and antileishmanial [25].

Thus, acetanilide derivatives have been the target of studies, due to their promising antimicrobial activities. To date, there are no studies in the literature regarding the antifungal activity of 2-bromo-*N*-phenylcetamide (A1Br). However, in the study Katke *et al.* [26] and

Aschale[27] with chloroacetamide derivatives found antifungal and antibacterial action and considered a strong antimicrobial activity.

In view of the increased incidence of cryptococcosis and the risk of toxicity of the antifungals used in clinical, it is necessary to look for new therapeutic alternatives with antifungal action, with A1Br being a candidate. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in silico* and *in vitro* the antifungal activity of A1Br, as well as to investigate the mechanism of action, a study of association with antifungals and *in vitro* toxicity.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 Chemistry

Aniline, potassium carbonate (K_2CO_3), bromoacetyl bromide, ethanol and chloroform and were purchased (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of hydrogen (1H) at 400 MHz using the deuterated chloroform ($CDCl_3$) and carbon (^{13}C) solvent were obtained at 101 MHz using $CDCl_3$, both using the Bruker Avance device 400. The infrared spectrometer on the Shimadzu (IR) model IRPrestige-21 FT-IR with an attenuated total reflection accessory (Supplementary Material). For the purification of the compound, recrystallization technique was used and the purity was evaluated through the measurement of the melting point using the MQAPF-302 (Microchemistry) apparatus.

2.2 Preparation of A1Br

In a 50 mL flask containing K_2CO_3 (3.31 g, 24 mmol) and aniline (1.86 g, 20 mmol) contained in $CHCl_3$ (20 mL) at a temperature of $0^\circ C$, 2-bromoacetyl bromide (4.84 g, 24 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was removed from the ice-cooling and was stirred at room temperature for 20 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure, yielding a precipitate. After 20 h of reaction, the solid was filtered, washed with a little chloroform and the combined organic phase was removed under reduced pressure and generating a solid. The solid obtained was recrystallized from an ethanol/water mixture (8: 2). Yield: 80% M.P. $130-132^\circ C$ (Lit.:¹ $129-131^\circ$). IR (ATR) ν/cm^{-1} 3294 (NH), 3145, 3037 (CH_{Ar}), 1654 (C = O), 1606 (N-H), 1554, 1498 ($C=C_{Ar}$), 1444 (CH_2), 1111 (C – Br), 758 (CH_{Ar}). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.13 (s, 1H), 7.53 (dd, J 8.6, 1.0 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.39 – 7.32 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.17 (ddd, J 8.6, 2.2, 1.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.02 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.53, 137.76, 128.25, 123.73, 119.36, 29.29. The A1Br compound was characterized and the data corroborated with Xie *et al.* [28].

The solutions A1Br and standard antifungals, Amphotericin B and Voriconazole (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) were solubilized in 5% dimethylsulfoxide and 2% Tween 80 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), and using sterile distilled water.

2.3 Culture Mediums

The culture media RPMI-1640 L-glutamine and without sodium bicarbonate (Difco Laboratories Ltd., USA, France, and INLAB, São Paulo, Brazil) were used the antifungal evaluation test and Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco Laboratories Ltd., USA, France) to maintain the strains. These materials were prepared according to the specifications pre-established in the manufacturer's protocol.

2.4 Microorganisms and Inoculum Preparation

Strains of *C. neoformans* of clinical and standard origin were used of the collection Mycology Laboratory, Federal University of Paraíba. In this study, 18 strains of clinical origin (LM-22, LM-49, LM-108, LM-120, LM-230, LM-258, LM-260, LM-287, LM-300, LM-309, LM-525, LM-528, LM-820, LM-1147, LM-1401, LM-1801, LM-1907, LM-2601) and the standard strain INCQS 40221.

The strains were preserved in SDA at 4°C. The inoculum was prepared in fresh cultures, a fungal suspension adjusted to a scale of 0.5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU mL⁻¹) and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72 hours.

3.5 In silico Analysis

3.5.1 PASS Online

The biological potential of A1Br as an antimicrobial agent was assessed by the PASS software online[29-31] (<http://www.way2drug.com/passonline>). The forecast is analyzed by obtaining the Pa and Pi indices and categorizing whether a substance is likely to be active or inactive, respectively according to the interactions of the structure-activity relationship with known biological entities [29, 31].

3.5.2 Molinspiration

The Molinspiration Molecule Viewer software[32] (<http://www.molinspiration.com>) allows, through physical-chemical parameters, the prediction of the theoretical oral bioavailability of the molecule, according to the "Rule of Five" described by Lipinski[31-34]. In

this rule, if the molecule has scores of at least 3 parameters that meet the requirements: total polar surface area -TPSA<140 Å²; molecular weight- MW <500 daltons; a number of hydrogen donors -nDLH ≤ 5; partition coefficient (water/oil) - cLogP ≤ 5, number of hydrogen acceptors - nALH ≤ 10), the compound will theoretically have good oral bioavailability [30,34-36].

3.5.3 Molecular docking

Molecular Virtual Docker (MVD) software (v 6.0.1, Molegro ApS, Aarhus, Denmark) was used to analyze the molecular docking of the studied enzymes. The enzymes were obtained from the Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), together with their cocrystallized inhibitors, under the PDB ID: 3SFY (2.1 Å), 6ISJ (2.3 Å) and 6TZ8 (3.3 Å). To optimize the geometry of the molecule, the molecular mechanics method and the Austin Model 1 semi-empirical method[37,38] were used through the Hyperchem v program. 8.0.3.

3.6 Antifungal Activity Assay

3.6.1 Minimum inhibitory concentration (MIC)

In a 96-well microplate, using the broth microdilution technique, MIC was determined[39-41]. In all wells, 100 µl of RPMI-1640 doubly concentrated was placed. Subsequently, in the first line, 100 µl of the doubly concentrated A1Br substance was added to the 1024 µg mL⁻¹ to 0.007 µg mL⁻¹ cavity. After, 10 µl aliquots of inoculum suspension were added. In parallel, MIC determination was performed for a positive control with standard amphotericin B antifungals and voriconazole. Control of the sterility of the medium, growth of the strain, and emulsifying agents were also carried out. The test was incubated at 35 ± 2 °C for 72 hours. The results were analyzed to determine the MIC that corresponds to the lowest concentration capable of visibly inhibiting the growth of yeast in comparison with the controls.⁴² The experiment was carried out in triplicate and the results were expressed as the arithmetic mean.

To detect antifungal activity or inactivity of A1Br, MIC was interpreted: strong inhibitors/excellent activity, if the value is 50-500 µg mL⁻¹; moderate: 600 - 1500 µg mL⁻¹; and weak or inactive inhibitors when the value is above 1500 µg mL⁻¹ [43].

The protocols of CLSI document M27-A3 were used to assess the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and voriconazole, considering MIC > 1µg mL⁻¹ resistance and MIC ≤ 1µg mL⁻¹ susceptible strain [39].

3.6.2 Minimum fungicidal concentration (MFC)

After determining the MIC, 10 μL of the supernatant from the microplate well where total fungal growth inhibition (MIC, MIC x2, MIC x4) occurred was added to a plate containing 100 μL of RPMI-1640 and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72 hours. The MFC corresponded to the lowest concentration capable of inhibiting the visible fungal growth[42, 44, 45]. The test was performed in triplicate results were expressed as the arithmetic.

3.6.3 Effect of the Sorbitol Assay

The A1Br MIC was determined by the broth microdilution technique[40,41] in the absence and presence of 0.8 mol L^{-1} of sorbitol with two representative strains (LM -22 and INCQS 40221).

In a microplate, 100 μL of RPMI-1640 with sorbitol (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) was placed cavity doubly concentrated. After 100 μL of the A1Br emulsion also doubly concentrated were placed in the cavity and through a serial dilution in the proportion of two were obtained in a final concentration of 0.8 mol L^{-1} . Subsequently, 10 μL of the *Cryptococcus neoformans* inoculum was placed to each well.

The control of microorganisms was performed with 200 μL culture medium supplemented with sorbitol and 10 μL of the inoculum of the strain *Cryptococcus neoformans*. In parallel, sterility control was also carried out. The experiments were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72 hours. The interpretation was given through the MIC values. If the A1Br MIC remains unchanged, the compound does not act on this mechanism. However, if MIC values increase in the sorbitol medium, it means that the cell wall is one of the possible mechanism targets for the substance [46]. The test was performed in triplicate results were expressed as the arithmetic.

3.6.4 Interaction A1Br x Ergosterol assay

The ergosterol assay was performed by the microdilution technique in the presence and absence of this reagent through the MICs of A1Br strains of *Cryptococcus neoformans* (INCQS 40221 and LM-22). In one plate, RPMI-1640 was added with and without the addition of ergosterol to 400 g mL^{-1} (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil). In parallel, similar to the one previously performed, species control was performed using 100 μL of the culture medium with or without ergosterol and 10 μL of each of the suspension. The tests were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72h and analyzed in triplicate[47].

The MICs arithmetic mean was performed, and interpretation was given according to Escalante *et al.*[47]: If the A1Br MIC remains unchanged, it is suggested that the substance does not act by this mechanism. However, if A1Br activity on this target, will prevent the substance from attaching to the ergosterol membrane and, as a result, the A1Br MIC will increase over the control.

3.6.5 Association study

The Fraction Inhibitory Concentration Index (FICI) was determined using the checkerboard technique through the combined effect of A1Br-amphotericin B and A1Br-voriconazole. Thus, 100µL of RPMI-1640 was added cavity. Then, dilutions of A1Br and antifungals tested between MIC/16 - MICx8 were performed. Subsequently, 50 µL each concentration was added vertically (amphotericin B or voriconazole) and 50 µL A1Br horizontally in the microplate. After, 20 µL of the *Cryptococcus neoformans* suspension [48].The test was incubated at 35 ± 2 ° C for 72 hours and performed in triplicate.

To calculate the FICI the equation was used: $FICI = FIC_X + FIC_Y$, where 'X' represents A1Br and 'Y' the standard antifungal (amphotericin B or voriconazole). The $FIC_X = MIC_{X \text{ Combined}} / MIC_{X \text{ Alone}}$ ratio, while the $FIC_Y = MIC_{Y \text{ Combined}} / MIC_{Y \text{ Alone}}$ ratio. The interpretation of the index according to values obtained and classified as: synergism = $FICI \leq 0.5$, additivity = $0.5 < FICI < 1.0$, indifference = $1.0 < FICI < 4.0$ and antagonism = $FICI \geq 4.0$ [48,49].

3.7 Human erythrocytes

The tests using blood samples from healthy young adults of type (A, B and O) were carried out according to the ethics committee (Opinion Number: 3.621.284).

3.7.1 Hemolytic activity

The human blood samples were diluted in 0.9% NaCl in the proportion of 1:30 and centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes to obtain the suspension of erythrocytes at 0.5%. Subsequently, the substance A1Br in concentrations of 50, 100, 500 and 1000 µg / mL was added to the suspensions. For the controls, an erythrocyte suspension was performed without treatment that corresponds to 0% hemolysis as a negative control and an erythrocyte suspension treated with 1% Triton X-100 corresponding to a 100% hemolysis as a positive control.

The samples were incubated for 1 hour at 22 ± 2 °C with slow and constant shaking at 100 rpm. After incubation the samples were centrifuged and hemolysis was quantified by

spectrophotometry at a wavelength of 540 nm [50]. The tests were performed in triplicate and the results expressed as a percentage that represents the arithmetic mean.

3.7.2 Antihemolytic activity

Red blood cell suspensions at 0.5% were treated with A1Br for 1 h at 22 ± 2 ° C at concentrations (50, 100, 500 and 1000 µg / mL). After that time, the samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 min and the supernatant was discarded and the erythrocytes were resuspended in 0.24% hypotonic sodium chloride solution for one hour at 22 ± 2 ° C. Then, the samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 min and the supernatant hemolysis was quantified by spectrophotometry at 540 nm [51].

For the negative control, erythrocyte suspension was performed without treatment (0% hemolysis) and a hypotonic solution of 0.24% sodium chloride (100% hemolysis) as a positive control. The tests were performed in triplicate and the results expressed as a percentage representing the arithmetic mean.

3.8 Statistical analysis

Statistical analyzes were performed to determine significant differences between the treated and untreated groups by unidirectional analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post-test. The results were plotted using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The statistical difference was established at values of $p < 0.05$, represented by asterisks in the figures.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In silico Analysis

The organic compounds explored in the drug research process require the use of rapid methods, capable of identifying, among others, their probable pharmacological activities. One of the main techniques used for this purpose are *in silico* techniques, computational methods that have the advantages of not using animals, costs and minors, a shorter analysis time in indicating factors that qualify a compound as a promising candidate for the development of drugs through the prediction of the spectrum of biological activity, oral bioavailability and toxicological risks [52].

In the analysis of the potential possibilities of A1Br activities, obtained by the PASS online tool, it was revealed that the molecule showed similarity with 17 activity possibilities for

Pa > 70%, in addition to 410 properties with Pa > 30%, we highlight among the antimicrobial activities: antiviral for *Picornavirus* (Pa: 0.473 and Pi: 0.063), antiviral for *Adenovirus* (Pa: 0.337 and Pi: 0.062) and anthelmintic (Pa: 0.380 and Pi: 0.051). Antibacterial activity has been reported with Pa < 30% and no antifungal activity has been demonstrated.

The pharmacokinetic parameters were verified *in silico* of A1Br based on the calculations of the physicochemical properties can be seen in Table 1. The TPSA correlates the passive transport of the molecule to predict intestinal absorption, the permeability of the Caco-2 monolayers and the passage through blood brain barrier [53,54]. The parameter number of rotating bonds (nROTB), is associated with the flexibility of the molecule for interaction with an enzyme that correlates the number of simple bonds, outside a ring, attached to a non-terminal atom. Therefore, the more simple bonds the molecule has, the greater the interaction with the enzyme facilitating the transposition of the barrier [55,56].

According to Ullah *et al.* [57] compounds with a TPSA less than or equal to $140 \text{ \AA}^2$ and an nROTB less than or equal to 10 had a high probability of good oral bioavailability. Therefore, A1Br fits within this probability, since the TPSA was $29.10 \text{ \AA}^2$ and the nROTB was 2. In the analysis of antifungals, amphotericin B presents TPSA = $319.61 \text{ \AA}^2$, that is, above $140 \text{ \AA}^2$ and intravenous use is available in different injectable formulations: complex, liposomal and non-lipid [58]. In voriconazole analysis, TPSA was less than $140 \text{ \AA}^2$ nROTB less than 10 is available for oral administration [31, 59].

According to Lavorato *et al.* [60] the MlogP (partition coefficient) is estimated by the value of the contributions of the molecular fragments to check the permeability of the substances across the plasma membranes, the higher the better transport across the membranes. Thus, A1Br had an MlogP of 1.85, higher than amphotericin and voriconazole, presenting a positive criterion for its bioavailability. In addition, the antifungal efficacy of this substance can be explained by the presence of halogenated substituent, since antifungals such as fluconazole and clotrimazole have halogens in their structure, which contributes to greater effectiveness [61, 62].

Table 1. *In silico* analysis of A1Br compared to standard antifungals.

Parameters	A1Br	Amphotericin B	Voriconazole
<i>Physicochemical Properties^a</i>			
Formula	C ₈ H ₈ BrNO	C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₅ O
MW	214.08	924.08	349.32
nROTB	3	3	5
nALH	2	12	6
nDLH	1	18	1
TPSA	29.10	319.61	76.73
cLogP	1.72	0.32	1.49
MlogP	1.85	-2.49	1.49
Volume	150.12	865.48	265.11
<i>Pharmacokinetics^b</i>			
GI Absorption	High	Low	High
BBB Permanent	Yes	No	Yes
<i>Druglikeness^c</i>			
GPCRL	-0.81	-3.06	0.23
ICM	-0.68	-3.53	0.17
KI	-0.99	-3.59	0.14
NRL	-0.92	-3.45	-0.22
PI	-1.25	-2.45	0.02
EI	-0.54	-2.95	0.19

Physicochemical Properties^a: MW=molecular weight; nROTB: rotation number ; nALH=number of hydrogen acceptors; TPSA= total polar surface area; nDLH= number of hydrogen donors; cLogP=partition coefficient water: oil; MlogP=octanol:water partition coefficient
^bPharmacokinetics^b: GI: Gastrointestinal tract; BBB:Blood-brain barrier; ^cDrug-likeness^c: GPCRL: GPCR ligand; ICM: ion channel modulator; KI: kinase inhibitor; NRL: nuclear receptor binder; PI: protease inhibitor; EI: enzymatic inhibitor.

Then, the molecular properties of A1Br were calculated, based on descriptors using the rule of five by Lipinski [34]. This substance has a nALH equal to 2; nDLH equal to 1; MW 214.06 Da; cLog P 1.72; TPSA 29.10Å². Thus, A1Br presented a probability of good oral bioavailability.

Meanwhile, amphotericin violated 4 out of 5 rules, which is consistent with intravenous administration.

In the analysis of potential as a drug candidate, A1Br presented the drug-score (DS) parameter 0.13 lower than voriconazole (DS: 0.84) and amphotericin B (DS: 0.27). DS values between 0.1 and 1.0 indicate that the evaluated molecule contains frequent groups in commercial drugs. Thus, A1Br presented a minimum value, but it cannot be disregarded, since itraconazole (DS: 0.07) is a drug used, it presents this parameter in a lower value than A1Br.

After analyzing the pharmacokinetic properties, the interaction of pharmacological targets [32] of A1Br was evaluated using the Molinspiration software.

The analysis data of the enzyme inhibition software (EI) of voriconazole corroborate a mechanism of action already elucidated in the literature that corresponds to the inhibition of lanosterol 14- α -demethylase, an enzyme called ergosterol biosynthesis. On the other hand, the amphotericin EI score was - 2.59, well below voriconazole, corroborating the described mechanism of action [63]. Similar to amphotericin B, A1Br also showed all its negative parameters, which suggests that the compound's mechanism of action may be interaction with ergosterol.

In the toxicological analysis, the software also estimated the risks of side effects through the pharmacological parameters: mutagenic, tumorigenic, irritating, and reproductive effects (Frame 1).

The A1Br molecule is at high risk of developing tumorigenic and reproductive effects, moderate mutagenic and low risk of developing irritating effects. In the study Machado *et al.* [64] in an *ex vivo* model with chorioallantoic membrane and pig tissue found that one of the chloroacetamide derivatives did not show irritability and did not cause histopathological damage, inflammation or changes in the pig's skin tissues. However, when evaluating the toxicity of monohaloacetamides in the embryonic zebrafish model, Ding *et al.* [65] found significant toxic effects in reducing the reduced incubation rate, curved body axis and pericardium, edema of the yolk sac, increased mortality and changes in locomotor behavior. Another study, such as the one carried out by Moore *et al.* [66] in an acute and subchronic analysis in rats and mice with some acetamides verified a low cytotoxic, clastogenic, aneugenic or mutagenic potential.

Frame 1. Risk of toxicity of A1Br compared to standard antifungals

Compound	Toxicity Risk ^a			
	Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive
A1Br				
Voriconazole				
Amphotericin B				
Itraconazole				

^a  non toxic ;  moderately toxic;  high toxic

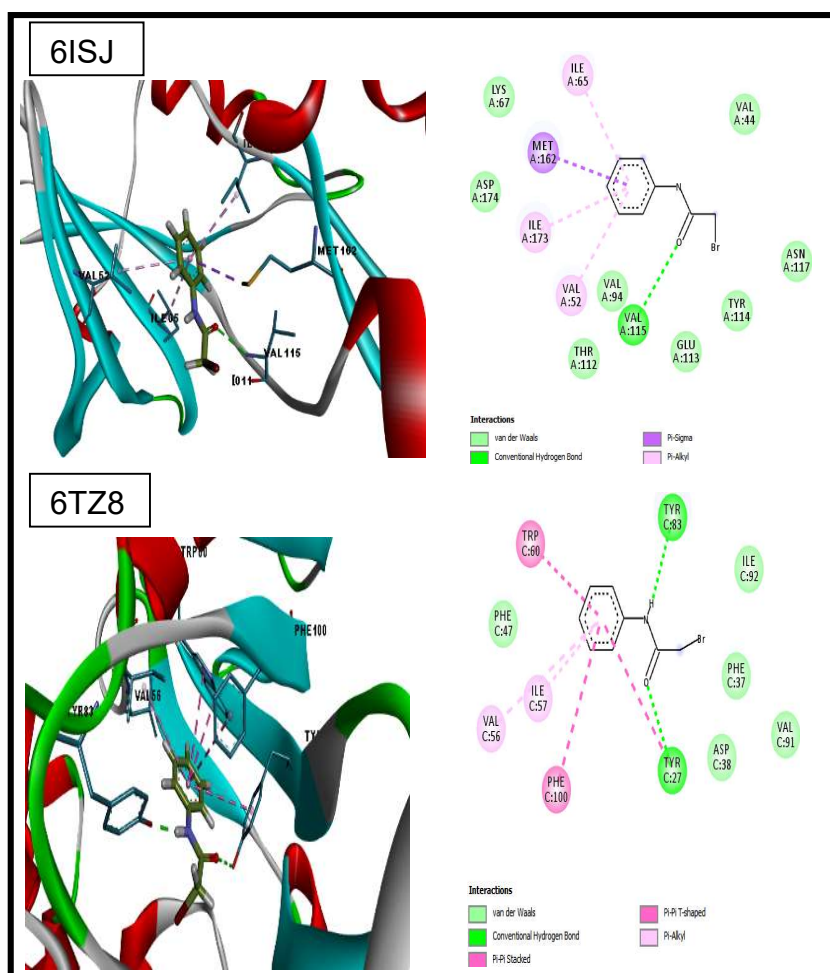
Molecular docking was performed to analyze A1Br anchorage in *C. neoformans* enzymes and suggest a possible active site for this molecule. All Root Mean Standard Deviation (RMSD) values for the tested enzymes were below the acceptable range, showing that the parameters used for molecular docking were accurate and valid [67]. A1Br showed better interaction energies for enzymes 6ISJ and 6TZ8, $-50.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and $-59.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectively. For the 3SFY enzyme, the A1Br compound did not perform the interactions necessary for good anchoring, a fact that explains the high binding energy in this active site (Table 2). The good anchoring of A1Br in 6ISJ and 6TZ8 (Figure 1) can be explained by the interactions performed.

As seen in figure 1, for the 6ISJ enzyme, A1Br performed interactions by hydrogen bonding with Val115 and hydrophobic bonds with Met162 and Asp174 residues. With the 6TZ8 enzyme, it performed the hydrogen bonding interactions with Tyr83 and 27 and the hydrophobic interaction with Asp38. All of these interactions described are similar to those performed by co-crystallized inhibitors and are necessary interactions for good anchoring in these binding sites [68,69]. Thus, the results suggest that A1Br presented binding energy and favorable interactions for adequate anchorage in enzymes 6ISJ and 6TZ8, being a possible site of action of the substance. Since the enzyme 6ISJ is among the kinases associated with cell cycle and growth regulation [70], while 6TZ8 is part of the calcineurin pathway that is responsible for maintaining growth, responses to stress, resistance to drugs and virulence in *Cryptococcus* spp. [68]. Molecules that act on these targets can lead to changes in cell integrity and can consequently induce cell lysis, making A1Br a promising molecule.

Table 2. Enzymes obtained from the PDB, their RMSD and Moldock Score values.

Enzyme	RMSD (Å)	Moldock Score (kcal.mol ⁻¹)
3SFY	0.17	-40.6
6ISJ	0.23	-98.4
6TZ8	0.17	-268.7

RMSD= Root Mean Standard Deviation ; PDB=Protein Data Ban

Figure 1. Interactions of A1Br with enzymes 6ISJ and 6TZ8

In vitro Analysis

MIC and MFC of A1Br with standard antifungals on Cryptococcus neoformans

The MICs of A1Br against strains of *Cryptococcus neoformans* varied from 0.25 to 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 3), showing good antifungal activity *in vitro*.

The MIC_{50%} was 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ which corresponds to the ability to inhibit the growth rate of *Cryptococcus neoformans* by 50%, while at the concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, it completely inhibited the growth of fungi. According to Sartoratto *et al.* [43] the MIC results will be considered as: strong inhibitors/excellent activity if the value is 50-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; moderate: 600 - 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; and weak or inactive inhibitors when the value is above 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Based on this result, we can classify A1Br as a strong inhibitor against *Cryptococcus neoformans* strains.

To assess the type of A1Br antifungal effect the MFC_{50%}/MIC_{50%} ratio was used when the ratio was equal to 1 the effect will be fungicidal and when the ratio is greater than 4 fungistatic [44]. Thus, the activity A1Br played a fungicidal action.

In the study by Bravo *et al.* [71] evaluated the antifungal activity derived from acetamide against *Candida albicans* and found that the halogenated derivatives had the highest bioactivity compared with methylated derivatives, thus favoring a better antimicrobial activity. In addition, a study by Machado *et al.* [64] found that 3 chloroacetamide derivatives were effective against *Microsporum* spp. and *Trichophyton* spp. and *Candida* species with MIC <50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. It is suggested that this good A1Br antifungal activity showed activity against *C. neoformans* due to the presence of bromine halogen.

In this study, the positive controls standard antifungals were shown to be susceptible to all yeast strains tested, since no strain had a MIC resistance breakpoint for the drugs, following the CLSI M27-A3 [39] protocol. Also, the MIC values are in agreement with other reports in the national and international literature showing MICs $\leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ against *Cryptococcus neoformans* regardless of the geographic origin [72-76].

Table 3. MIC and MFC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for A1Br and standard antifungal against *Cryptococcus neoformans* strains.*

Strains	A1Br		Voriconazole		Amphotericin B	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
INCQS 40221	0.5	0.5	0.0625	0.0625	0.25	0.5
LM 49	0.5	1.0	0.0625	0.0625	0.125	0.25
LM108	0.5	0.5	0.0625	0.0625	0.125	0.25
LM120	0.5	1.0	0.0625	0.125	0.125	0.25
LM230	0.5	1.0	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM258	1.0	2.0	0.0625	0.0625	0.125	0.25
LM260	1.0	2.0	0.0031	0.0625	0.125	0.25
LM287	0.5	1.0	0.0625	0.125	0.125	0.25
LM300	0.25	0.5	0.0031	0.0625	0.25	0.5
LM309	0.25	0.5	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM528	1.0	2.0	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM820	1.0	2.0	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM1147	0.5	0.5	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM1401	0.5	0.5	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM1801	0.5	0.5	0.0625	0.0625	0.25	0.5
LM1907	0.5	0.5	0.0625	0.125	0.25	0.5
LM2601	0.5	1.0	0.0625	0.0625	0.25	0.5

MIC: Minimum inhibitory concentration; MFC: Minimum fungicidal concentration *Control of microbial in the absence of the A1Br or antifungal.

Mechanism of action A1Br

To investigate the mode of action, A1Br was tested in sorbitol assays. In Table 4, the MIC of A1Br remained unchanged, suggesting that its action may not occur by this mechanism in *Cryptococcus neoformans* strains.

Table 4. MIC A1Br ($\mu\text{g mL}^{-1}$) on the strains of *Cryptococcus neoformans* in the of sorbitol assay.

Strains	MIC A1Br	
	Absence of Sorbitol	Presence of Sorbitol
INCQS 40221	0.5	0.5
LM 22	0.5	0.5

MIC: Minimum inhibitory concentration.

However, when exploring the interaction between A1Br ergosterol [47,77,78] (Table 5) for *C. neoformans* strains (INCQS 40221 and LM-22), MIC increased eight times. The considerable increase in MIC suggests that the compound can cause damage to the

membrane, inducing changes in permeability and fluidity or promoting a barrier that prevents the interaction between A1Br and ergosterol. Besides, other pharmacological targets have not been tested, with the possibility that the compound acts by another mechanism.

Table 5. MIC A1Br ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in *Cryptococcus neoformans* strains for ergosterol assay.

Strains	MIC A1Br	
	Absence of Ergosterol	Presence of Ergosterol
INCQS 40221	0.5	4
LM 22	0.5	4

MIC: Minimum inhibitory concentration.

The mechanism involving A1Br in microorganisms has not been observed in the literature. Therefore, it is the first study to evaluate this possible mechanism for this substance. Despite, Machado *et al* [64] when evaluating the mechanism of chloroacetamide derivatives verified that they do not act by complexing with ergosterol, suggesting that it may act on other targets of the fungal cell membrane. However, in clinical therapy, the antifungal agents used contain halogens in their structure, such as fluorine and chlorine [61,62]. The antifungal action of A1Br probably due to its lipophilic characteristics due to the presence of halogenated bromine, must be evaluated through quantitative structure-activity studies.

Interaction profile of A1Br with amphotericin B and voriconazole

According to the interpretation of the FICI, the interaction between A1Br and amphotericin B (FICI = 16) and A1Br and voriconazole (FICI = 16) was of the antagonist type (Table 6). the first study to analyze the possible effect of A1Br when associated with standard antifungal agents against *Cryptococcus neoformans*.

Some hypotheses can be raised to explain the A1Br antagonism. The interaction may have caused a change in pharmacological activity, promoting a decrease or inactivation of one or both substances through antagonistic pharmacodynamic interaction, losing antifungal activity, or they may have reacted and formed a new inactive product. Also, A1Br may be chemically incompatible with the antifungal agents used and this may result in the loss of the pharmacological activity of one or both substances of the combination, which would lead to the therapeutic failure of possible treatment with the associations previously described.

Thus, despite the antagonistic association between the substances, the positive results previously presented for antifungal activity on *Cryptococcus neoformans* strains stimulate new research of the compound.

Table 6. (a) Association of A1Br and Voriconazole **(b)** Association of A1Br and Amphotericin B on strains of *Cryptococcus neoformans*.

(a)

Strains	FIC _x	FIC _y	FICI	Interaction Type
	A1Br	Voriconazole		
INCQS40221	8	8	16	Antagonism
LM 22	8	8	16	Antagonism

(b)

Strains	FIC _x	FIC _y	FICI	Interaction Type
	A1Br	Amphotericin		
INCQS40221	8	8	16	Antagonism
LM 22	8	8	16	Antagonism

FIC_x: fractioned inhibitory concentration of "X" express A1Br; FIC_y: fractioned inhibitory concentration of "Y" express references antifungal drug. FICI: fractionated inhibitory concentration index. FICI ≥ 4.0 = antagonism; 1 < FICI < 4 = indifference; 0.5 < FICI < 1.0 = additivity; FICI ≤ 0.5 = synergism.

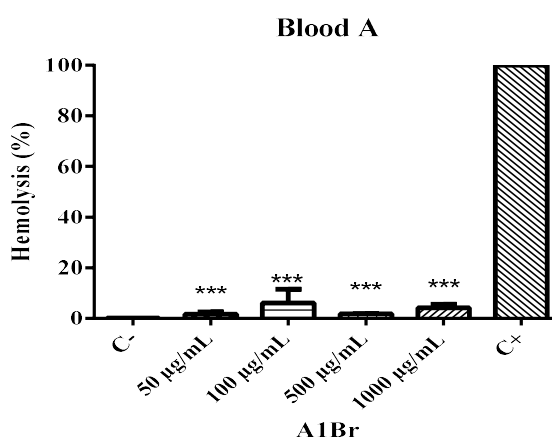
The prospecting of new bioactive substances with antifungal potential aims at the development of safe compounds in human cells, acting specifically on fungal cells [79].

Thus, according to a study by Rangel *et al.* [80] established parameters to assess the toxicity of promising drugs in red blood cells considering the percentage of hemolysis as low when it is between 0 and 40%, moderate when it is between 40 and 80% and high when it is above 80%. In this perspective, the A1Br compound showed low levels of hemolysis in the tested concentrations (50, 100, 500 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), for blood types A, B and O compared to the negative control, as expressed in graphs 2a, 2b and 2c.

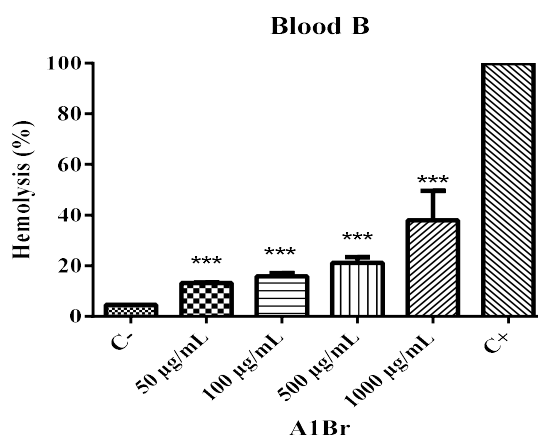
In this analysis of the hemolytic potential, it was found that A1Br at the concentrations tested (50 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtained a hemolysis considered to be moderate/ low around (3% to 43%); the concentrations 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ showed low hemolysis with an average ranging from (5% to 10%), there was variation according to the blood type and substance evaluated in the test.

The results suggest that the A1Br molecule has less potential for hemolysis in type A blood, suggesting a better interaction of these molecules with N-acetylgalactosamine, responsible for the best activity in higher concentration of the molecule. Thus, it appears that the best interaction of A1Br with ABO system in the sequence $A < O < B$. Thus, the low hemolytic potential of A1Br corroborates with a study by Gentile and Calabrese [81] investigated the cytotoxicity derived from acetamide, a low level of toxicity against erythrocytes from rats, sheep and dogs.

(a)



(b)



(c)

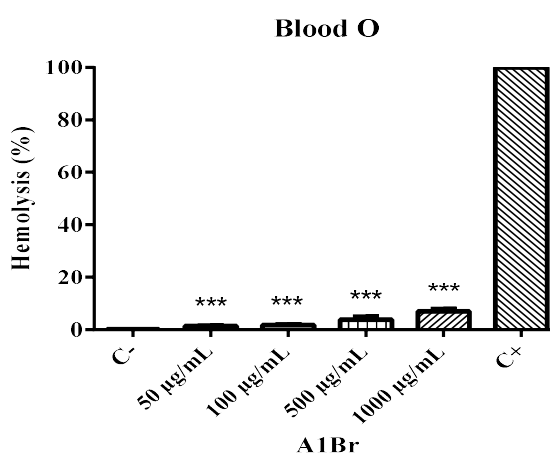


Figure 2. (a) Cytotoxic effect of A1Br against erythrocytes type A, (b) type B and (c) type O; (C⁻) Negative control (erythrocytes 0.5%), (C⁺) Positive control (Triton X-100 at 1%). The statistical difference being considered $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) statistically significant compared to the positive control.

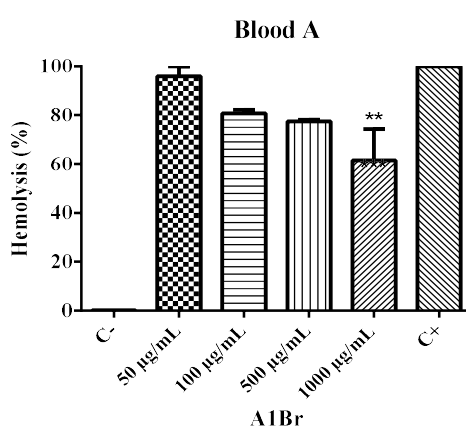
It is known that the integrity of the cell membrane depends on cell tone and the presence of substances that may interfere with its structural matrix [82]. Therefore, when a molecule is a candidate for a drug, it is considered of fundamental importance to evaluate the potential of resistance of the erythrocyte membrane to the possible damage caused by the tested substance.

The anti-hemolytic evaluation of the A1Br molecule showed moderate hemolysis ($> 40\%$ and $< 80\%$) [80] for concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in blood types A, B, O as seen in

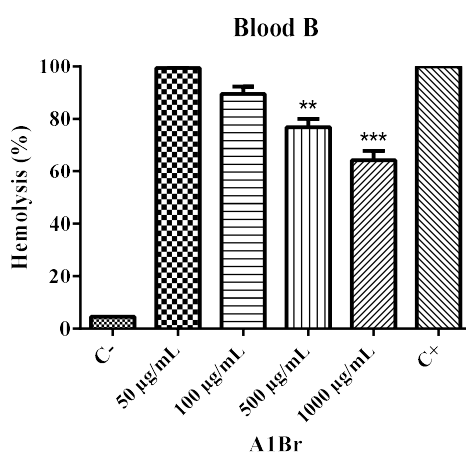
graphics 3a, 3b and 3c. Thus, it can be observed that the osmotic protection capacity of A1Br increases the concentration of the substance.

The anti-hemolytic potential of A1Br showed moderate protection potential for the red cells of the ABO system at the concentrations tested (500 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The percentage of lysis occurred in that order $O < A < B$. In the study Autore *et al.* [83] when evaluating the toxicity potential derived from acetamide in liver cell lines, found a low toxicity potential revealing that they may have antioxidant activity.

(a)



(b)



(c)

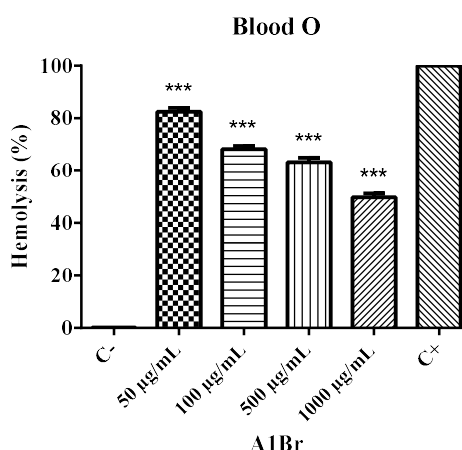


Figure 3. (a) Anti-hemolytic effect of A1Br against erythrocytes type A, (b) type B and (c) type O; (C-) Negative control (erythrocytes 0.5%), (C +) Positive control (NaCl 0.24%). The statistical difference being considered $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) statistically significant compared to the positive control.

CONCLUSION

According to the results obtained, the A1Br study *in silico* verified a desirable profile of the molecule to be a candidate for a new drug and, in the *in vitro* investigation, potential antifungal activity, with fungicidal effect and possibly related mechanism of action to its binding to ergosterol. The results of the association demonstrated antagonistic effects on the tested fungi strains. Cytotoxicity analyzes show favorable results of the molecule. Thus, the data from this study showed promise, but more research is essential to understand the antifungal action of A1Br with other species and the *in vivo* toxicity in the prospective development of drug therapy for cryptococcosis.

LIST OF ABBREVIATIONS

A1Br	2-bromo- <i>N</i> -phenylacetamide
IR	Infrared Spectrum
NMR	Nuclear magnetic resonance
INCQS	National Institute for Quality Control in Health
LM	Mycology Laboratory
SDA	Sabouraud dextrose agar
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CFU	Colony Forming Units
DMSO	Dimethyl Sulfoxide

MFC	Minimum Fungicide Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MVD	Molegro Virtual Docker
MW	Molecular Weight
NC	Negative control
FIC	Fraction Inhibitory Concentration
FICI	Fraction Inhibitory Concentration Index
Pa	Active probability
Pi	Inactive probability
nROTB	Rotation number
nALH	Number of hydrogen acceptors
nDLH	Number of hydrogen donors
TPSA	Topological polar surface area
cLogP	Partition coefficient water:oil
MlogP	Octanol:water partition coefficient
GI	Gastrointestinal tract
BBB	Blood-brain barrier
GPCRL	GPCR ligand
ICM	Ion channel modulator
KI	Kinase inhibitor
NRL	Nuclear receptor binder
PI	Protease inhibitor
EI	Enzymatic inhibitor
PDB	Protein Data Bank
MVD	Molegro Virtual Docker
RDC	Red Blood Cell

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

Humans were used for studies of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors' thanks for the financing of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number: 302519/2012-2.

SUPPORTIVE/SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary information is infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of compound A1Br.

REFERENCES

1. Herkert, P. F.; Hagen, F.; Pinheiro, R. L.; Muro, M. D.; Meis, J. F.; Queiroz Telles, F. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. *J. Fungi* **2017**, *3*, 62.
2. Maziarz, E. K.; Perfect, J. R. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **2016**, *30*, 179-206.
3. Rajasingham, R.; Smith, R. M.; Park, B. J.; Jarvis, J. N.; Govender, N. P.; Chiller, T. M.; Denning, D. W.; Loyse, A.; Boulware, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 873-881.
4. Perfect, J. R.; Dismukes, W. E.; Dromer, F.; Goldman, D. L.; Graybill, J. R.; Hamill, R. J.; Harrison, T. S.; Larsen, R. A.; Lortholary, O.; Nguyen, M. H.; Pappas, P. G.; Powderly, W. G.; Singh, N.; Sobel, J. D.; Sorrell, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 291-322.
5. World Health Organization. *Guidelines for The Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children: Supplement to the 2016 Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection*. Geneve: <https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/cryptococcal-disease/en/> 2018 Accessed on October, 2020.
6. Belato, K. K.; Oliveira, J. R.; Oliveira, F. S.; Oliveira, L. D.; Camargo, S. E. A. Cytotoxicity and genotoxicity of thymol verified in murine macrophages (RAW 264.7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans*. *J. Funct. Foods* **2018**, *40*, 455-460.
7. Bongomin, F.; Oladele, R. O.; Gago, S.; Moore, C. B.; Richardson, M. D.; A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*. **2018**, *61*, 290-297.
8. Wiederhold, N. P. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 333-339.
9. Perlin, D. S.; Rautemaa-Richardson, R.; Alastruey-Izquierdo, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 383.
10. Kung, P. P.; Huang, B.; Zhang, G.; Zhou, J. Z.; Wang, J.; Digits, J. A.; Skaptason, J.; Yamazaki, S.; Neul, D.; Zientek, M.; Elleraas, J.; Mehta, P.; Yin, M. J.; Hickey, M. J.; Gajiwala, K. S.; Rodgers, C.; Davies, J. F.; Gehring, M. R. Dihydroxyphenylisoindoline amides as orally bioavailable inhibitors of the heat shock protein 90 (hsp90) molecular chaperone *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 499-503.
11. Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41638-47.
12. Kennedy, G. L. Biological effects of acetamide, formamide, and their mono and dimethyl derivatives: an update. *Crit. Ver. Toxicol.* **2001**, *31*, 139-222.
13. Brasil, P. F.; de Freitas, J. A.; Barreto, A. L. S.; Adade, C. M.; Reis de Sá, L. F.; Constantino-Teles, P.; Toledo, F. T.; de Sousa, B. A.; Gonçalves, A. C.; Romanos, M. T. V.; Comasseto, J. V.; Dos Santos, A. A.; Tessis, A. C.; Souto-Padrón, T.; Soares, R. M. A.; Ferreira-Pereira, A. A. Antiproliferative and ultrastructural effects of

- phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Parasitol. Int.* **2017**, *66*, 47-55.
14. Álvarez, G.; Varela, J.; Cruces, E.; Fernández, M.; Gabay, M.; Leal, S. M.; Escobar, P.; Sanabria, L.; Serna, E.; Torres, S.; Figueredo Thiel, S. J.; Yaluff, G.; Vera de Bilbao, N. I.; Cerecetto, H.; González, M. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1398-404.
 15. Georgiev, L.; Chochkova, M.; Ivanova, G.; Najdenski, H.; Ninova, M.; Milkova, T. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **2012**, *89*, 91-101.
 16. Khatkar, A.; Nanda, A.; Kumar, P.; Narasimhan, B. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of p-coumaric acid derivatives. *Arab. J. Chem.* **2014**, no prelo.
 17. Srikanth, J.; Sandeep, T.; Divya, K.; Govindarajan, R. Screening of in -vitro Anti-Inflammatory Activity of Some Newly Synthesized 1,3-Thiazine Derivatives. *Int. J. Pharm. Chem. Res.* **2013**, *3*, 213-220.
 18. Verma, A. K.; Martin, A.; Singh, A. K. Synthesis, Characterization and evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic activity of Benzothiazole derivatives. *Indian J.Pharm.Biol.Res.* **2014**, *2*, 84-89.
 19. Kumar, R.; Jain, S.; Jain, N. Synthesis and evaluation of acetaminophen derivatives as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents . *Der Pharma Chem.* **2013**, *5*, 73-78.
 20. Pattan, S. R.; Ali, M. S.; Pattan, J. S.; Purohit, S. S.; Reddy, V. V .K.; Nataraj, B. R. Synthesis and microbiological evaluation of 2-acetanilido-4-arylthiazole derivatives. *Indian J. Chem.* **2006**, *45 B*, 1929-1932.
 21. Konda, R. K.; Nuthakki, V. K.; Nagarjuna, R. Synthesis Characterization and Pharmacological Screening of Substituted Sulphonamide Derivatives . *Sch. Acad. J. Pharm.* **2014**, *3*, 344-349.
 22. Karier, P.; Kraus, G.; Kolber, I. Metazachlor traces in the main drinking water reservoir in Luxembourg: a scientific and political discussion. *Environ. Sci. Eur.* **2017**, *29*, 25.
 23. Roy, A.; Dumbare, N. R.; Harak, S. S.; Najeeb, M. Z. M.; Deshmukh, R. D. Synthesis Molecular Docking Studies and Biological Evaluation of 5-[4-(substituted) benzylidene or benzyl] Thiazolidine-2, 4-one with their Oral Hypoglycemic Activity. *Int. Res. J. Pharm.* **2013**, *4*, 151-157.
 24. Karatas, F.; Cansiz, A.; Kara, H.; Karatepe, M.; Koparir, M. Synthesis of two new acetanilide derivatives and their effect on the serum antioxidantvitamins (A, E, and C) and the MDA level in rats. *Bioorg. Khim.* **2005**, *31*, 553-6.
 25. Lavorato, S. N; Duarte, M. C; De Andrade, P. H. R; Coelho, E. A .F.; Alves, R. J. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2017**, *53*, e16067.
 26. Katke, S. A.; Amrutkar, S. V.; Bhor, R. J.; Khairnar, M. V. Synthesis of biologically active 2-chloro-*n*-alkyl/aryl acetamide derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2011**, *2*, 148-156.
 27. Aschale, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2 chloroacetanilides. *Int. J. Chemtech Res.* **2012**, *4*, 1437-1441.
 28. Xie, J. L.; Polvil, E. J.; Shekhar-Guturja, T.; Cowen, L. E.; *Future Microbiol.* **2014**, *9*, 523.
 29. Khurana, N. I.; Mohan, P. S.; Gajbhiye, A.; Goel, R. K. Pass assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **2011**, *662*, 22-30.
 30. Ferreira, S. B.; Dantas, T. B.; Silva, D. F.; Ferreira, P. B.; Melo, T. R. In silico *In Silico* and *In Vitro* Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum* *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 2186-2196.

31. Monteiro- Neto, V.; Souza, C. D.; Gonzaga, L. F.; Silveira, B. C.; Sousa, N. C. F.; Pontes, J. P.; Santos, D. S.; Martins, W. C.; Pessoa, J. F. V.; Carvalho-Júnior, A.R.; Almeida, V. S. S.; Oliveira, N. M. T.; Araujo, T. S.; Ferreira, D. M.; Mendes, S. J. F.; Ferro, T. A. F.; Fernandes, E. S. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Plos one* **2020**, 15(5):e0232987.
32. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area (PSA) as a sum on fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, 43(1), 3714-3717.
33. Gupta, A.; Aniyery, R. B.; Pathak, A. In silico pharmacological and in vitro biological study of novel organotin sorbate. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2017**, 8(10), 4201-4212.
34. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, 1(4), 337-341.
35. Ursu, O.; Oprea, T. I. Model-Free Drug-likeness from fragments. *J. Chem. Inf. Model* **2010**, 50(8), 1387-1394.
36. Ursu, O.; Rayan, A.; Goldblum, A.; Oprea, T. I. Understanding drug-likeness. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci* **2011**, 1(5), 760-781.
37. Dewar, M. Dewar, M. J. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J Am Chem Soc* **1985**, 07, 3902-39091.
38. Abreu, P. A.; Castro, C. H.; Carvalho, P. R.; Rodrigues, C. R.; Giongo, V.; Paixão, I. C. N. P.; Santana, M. V.; Ferreira, J. M.; Caversan, O. M.; Leão, R. A. C.; Marins, L. M. S.; Henriques, A. M.; Farias, F. M. C.; Albuquerque, M. G.; Pinheiro, S; Molecular modeling of a phenyl-amidine class of NMDA receptor antagonists and the rational design of new triazolyl-amidine derivatives. *Chem Biol Drug Des* **2013**, 81, 198-207.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts-Third Edition: Approved Standard M27-A3*; 2008; 1-13.
40. Cleeland, L.; Squires, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. *In Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed *In: Lorian VMD. Antibiotics in Laboratory Medicine* Ed.; Williams & Wilkins: Baltimore, EUA, 1991; pp. 739–788.
41. Hadacek, F.; Greger, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* **2000**, 11, 137-147.
42. Silva, D.; Diniz-Neto, H.; Cordeiro, L.; Silva-Neta, M.; Silva, S.; Andrade-Júnior, F.; Leite, M.; Nóbrega, J.; Morais, M.; Souza, J.; Rosa, L.; Melo, T.; Souza, H.; Sousa, A.; Rodrigues, G.; Oliveira-Filho, A.; Lima, E. (R)-(+)- β -citronellol and (S)-(-)- β -citronellol in combination with Amphotericin B against *Candida* spp. *Int J Mol Sci* **2020**, 21, 1785.
43. 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. *Braz. J. Microbiol.* **2004**, 35, 275-280.
44. 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. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, 7, 1797–1806.
45. Guerra, F. Q. S.; Mendes, J. M.; Oliveira, W. A.; Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M; Lima E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on multi-drug resistant *Acinetobacter* spp. strains. *Rev. Bio. Farm.* **2013**, 8, 62-7.
46. Frost, D. J.; Brandt, K. D.; Cugier, D.; Goldman, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J. Antibiot.* **1995**, 48, 306-10.

47. Escalante, A.; Gattuso, M.; Pérez, P.; Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1720-5.
48. 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. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 345-51.
49. Soares, L. A.; Gullo, F. P.; Sardi, J. E. C.; Pitangui, N. E. S.; Costa-Orlandi, C. B.; Sangalli-Leite, F.; Scorzoni, L.; Regasini, L. O.; Petrônio, M. S.; Souza, P. F.; Silva, D. H.; Mendes-Giannini, M. J.; Fusco-Almeida, A. M. Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**, 957860.
50. Rangel, M.; Malpezzi, E.L.; Susini, S. M.; De Freitas, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* **1997**, *35*, 305-309.
51. Dacie, J.V.; Lewis, S.M. Investigation of haemostasis. Practical haematology. 9th edn, London: Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited. 2001, 444-51.
52. Srinivas, N.; Sandeep, K. S.; Anusha, Y.; Devendra, B. N. . In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An *In Silico* Approach. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma*, **2014**, *2*(3), 20-29.
53. Pham-The, H.; Cabrera-Perez, M. A.; Nam, N. H.; Castillo-Garit, J. A.; Rasulev, B.; Le-Thi-Thu, H.; Casanola-Martin, G. M. In Silico assessment of ADME properties: advances in Caco-2 cell monolayer permeability modeling. *Curr. Top. Med. Chem.* **2019**, *18*, 2209-2229.
54. Lomize, A. L.; Hage, J. M.; Schnitzer, K. Golobokov, K.; LaFaive, M. B.; Forsyth, A. C.; Pogozheva, I. D. Physics-Based Method for Modeling Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model.* **2019**, *59*(7), 3198-3213.
55. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002**, *45*, 2615-2623.
56. Zhao, Y. H.; Abraham, M. H.; Le, J.; Hersey, A.; Luscombe, C. N.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I. Rate-Limited Steps of Human Oral Absorption and QSAR Studies. *Pharm. Res.* **2002**, *19*(10), 1446-1457.
57. Ullah, A.; Prottoy, N. I.; Araf, Y.; Hossain, S.; Sarkar, B.; Saha, A. Molecular Docking and Pharmacological Property Analysis of Phytochemicals from *Clitoria ternatea* as Potent Inhibitors of Cell Cycle Checkpoint Proteins in the Cyclin/CDK Pathway in Cancer Cells. *Comput. Mol. Biosci.* **2019**, *9*, (3), 81-94.
58. Bennett, J.; Dolin, R.; Blaser, M.; *Principles and practice of infectious diseases*. 8th ed. Elsevier, Philadelphia, 2016.
59. Quindós, G.; Carrillo-Muñoz, A. J.; Eraso, E. Cantón, E.; Pemán, J. In vitro antifungal activity of voriconazole: New data after the first years of clinical experience. *Rev. Iberoam. Micol.* **2007**, *24*(3), 198-208.
60. Lavorato, S. N.; Duarte, M. C.; Lage, D. P.; Tavares, C. A. P.; Coelho, E. A. F.; Alves, R. J. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 1052-67.
61. Corrêa, J. C. R; Salgado, H. R. N. Review of fluconazole properties and analytical for its determination. *Crit Rev Anal Chem.* **2011**, *41*, 270-279.
62. Crowley, P. D.; Gallagher, H. C. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 611-7.

63. Kathiravan, M. K.; Salake, A. B.; Chothe, A. S.; Dudhe, P. B.; Watode, R. P.; Mukta, M. S.; Gadhwe, S.; The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5678.
64. Machado, G. D. R. M.; Fernandes de Andrade, S.; Pippi, B.; Bergamo, V. Z.; Jacobus Berlitz, S.; Lopes, W.; Lavorato, S. N.; Clemes Kulkamp Guerreiro, I.; Vainstein, M. H.; Teixeira, M. L.; Alves, R. J.; Fuentefria, A. M. Chloroacetamide derivatives as a promising topical treatment for fungal skin infections. *Mycologia* **2019**, *111*, 612-623.
65. Ding, X.L.; Zhu, J.Y.; Zhang, J.; Dong, T.Y.; Xia, Y.K.; Jiao, J.D.; Wang, X.; Zhou, W. Developmental toxicity of disinfection by-product monohaloacetamides in embryo-larval stage of zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2020**, *189*, 110037.
66. Moore, M.M.; Gollapudi, B.; Nagane, R.; Khan, N.; Patel, M.; Khanvilkar, T.; Roy, A.M.; Ramesh, E.; Bals, B.; Teymouri, F.; Nault, R.; Bringi, V. The food contaminant acetamide is not an in vivo clastogen, aneugen, or mutagen in rodent hematopoietic tissue. *Reg Toxicol Pharmacol* **2019**, *108*, 104451.
67. Thomsen, R.; Christensen, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem.*, **2006**, *49*(11), 3315-21.
68. Juvvadi, P. R.; Fox, D.; Bobay, B. G.; Hoy, M. J.; Gobeil, S. M. C.; Venters, R. A.; Chang, Z.; Lin, J. J.; Averette, A. D.; Cole, D. C.; Barrington, B. C.; Wheaton, J. D.; Ciofani, M.; Trzoss, M.; Li, X.; Lee, S. C.; Chen, Y.; Mutz, M.; Spicer, L. D.; Schumacher, M. A.; Heitman, J.; Steinbach, W. J. Harnessing calcineurin-FK506-FKBP12 crystal structures from invasive fungal pathogens to develop antifungal agents. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, 4275.
69. Hast, M.A.; Nichols, C.B.; Armstrong, S.M.; Kelly, S.M.; Hellinga, H.W.; Alspaugh, J.A.; Beese, L.S. Structures of *Cryptococcus neoformans* protein farnesyltransferase reveal strategies for developing inhibitors that target fungal pathogens. *J Biol Chem.*, **2011**, *286*(40), 35149-62.
70. Ong, B.X.; Yoo, Y.; Han, M.G.; Park, J.B.; Choi, M.K.; Choi, Y.; Shin, J.; Bahn, Y.; Cho, H. Structural analysis of fungal pathogenicity-related casein kinase α subunit, Cka1, in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 14398.
71. Bravo, H.R.; Weiss-López, B.; Lamborot, m.; Copaja, S. Chemical basis for the antimicrobial activity of acetanilides. *J. Chil. Chem. Soc.* **2003**, *48*, 27-30.
72. Illnait-Zaragozi, M.T.; Martinez, G.F.; Curfs-Breuker, I.; Fernández, C.M.; Boekhout, T.; Meis, J.F. In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**; *52*, 1580-2.
73. Trilles, L.; Lazera, M. S.; Wanke, B.; Oliveira, R. V.; Barbosa, G. G.; Nishikawa, M. M.; Morales, B. P.; Meyer, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2008**; *103*, 455-62.
74. Souza, L. K. H.; Souza Jr, A. H.; Costa, C.R.; Faganello, J.; Vainstein, M. H.; Chagas, A. L. B.; Souza, A. C. M.; Silva, M. R. R. . Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses.* **2010**; *53*, 62-7.
75. Espinel-Ingroff, A.; Aller, A. I.; Canton, E.; Castañón-Olivares, L. R.; Chowdhary, A.; Cordoba, S.; Cuenca-Estrella, M.; Fothergill, A.; Fuller, J.; Govender, N.; Hagen, F.; Illnait-Zaragozi, M. T.; Johnson, E.; Kidd, S.; Lass-Flörl, C.; Lockhart, S. R.; Martins, M. A.; Meis, J. F.; Melhem, M. S.; Ostrosky-Zeichner, L.; Pelaez, T.; Pfaller, M. A.; Schell, W. A.; St-Germain, G.; Trilles, L.; Turnidge, J. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5898- 906.

76. Cardoso, P. H. M.; Santos, R. L. O.; Souza, A. C.; Baroni, F. A.; Domaneschi, C; Paula, C. R. Biosynthesis of phospholipases and proteinases using clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* *Clin. Lab. Res. Den.* **2018**, 1-5.
77. Tomazin, R.; Matos, T.; Meis, J. F.; Hagen, F. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility Testing of Sequentially Obtained Clinical *Cryptococcus deneoformans* and *Cryptococcus neoformans* Isolates from Ljubljana, Slovenia. *Mycopathologia* **2018**, *183*, 371-380.
78. Lima, I . O.; Pereira, F. O.; Oliveira, W. A. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J.Essent. Oil Res.* **2013**, *25*, 138-142.
79. Scorzoni, L.; Silva, A.C.A.P.; Marcos, C.M.; Assato, P.A.; de Melo, W.C.; de Oliveira, H.C. Costa-Orlandi, C.B.; Mendes-Giannini, M.J.; Fusco-Almeida, A.M. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front Microbiol.*, **2017**, *8*, 1-23.
80. Rangel, M.; Malpezzi, E.L.; Susini, S. M.; De Freitas, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* **1997**, *35*, 305-309.
81. Gentile, T.J.; Calabrese, E.J. Screening for potential hemolytic responses to environmental agents using a bioactivation system: evaluation of six pesticides. *J Environ Sci Heal A* **1987**, *22*, 427-444.
82. Mousinho, K.C.; Correia, M.B.L.; Silva, J.O.; Magnata, S.S.L.P.; Souza, I.A.; Catanho, M.T.J.A. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red bloods cells with technetium-99m and morphology of the cells. *Braz. arch. biol. Technol.*, **2008**, *51*, 1139-1146.
83. Autore, G.; Caruso, A.; Marzocco, A.; Nicolaus, B.; Palladino, C.; Pinto, A.; Popolo, A.; Sinicropi, M.S.; Tommonaro, G.; Saturnino, C. Acetamide Derivatives with Antioxidant Activity and Potential Anti-Inflammatory Activity. *Molecules* **2010**, *15*, 2028-2038.

6 CONCLUSÕES

- O composto 2-bromo-*N*-fenilacetamida apresenta uma ótima atividade antifúngica, contra as linhagens de *Cryptococcus neoformans*, sendo a natureza desse efeito produzido fungicida;
- O A1Br não atua sobre a parede celular de *C. neoformans*;
- O mecanismo de ação antifúngica do A1Br contra *C. neoformans* envolve a interferência na disponibilidade do ergosterol, causando perturbação na membrana plasmática antifúngica;
- O efeito antibiofilme forte A1Br foi observado contra *C. neoformans*;
- A associação 2-bromo-*N*-fenilacetamida-anfotericina B ou voriconazol foi antagonismo para todas as linhagens avaliadas, não sendo encontrados aditividade, sinergismo ou indiferente resultantes da associação dos dois produtos.
- Esse composto apresenta parâmetros de biodisponibilidade condizentes com fármacos que podem ser administradas por via oral no estudo *in silico*.
- O A1Br apresentou energia de ligação e interações favoráveis para a ancoragem adequada nas enzimas 6ISJ e 6TZ8, sendo um possível sítio de ação da substância.
- O A1Br exibiu teórico risco toxicológico reprodutivo e tumorigênico na análise computacional.
- O composto tem baixo potencial citotóxico nos eritrócitos do sistema ABO;
- Na análise fragilidade osmótica A1Br mostrou um moderado potencial de estabilidade e proteção a hemólise.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. A.; CASTRO, C. H.; CARVALHO, P. R.; RODRIGUES, C. R.; GIONGO, V.; PAIXÃO, I. C. N. P.; SANTANA, M. V.; FERREIRA, J. M.; CAVERSAN, O. M.; LEÃO, R. A. C.; MARINS, L. M. S.; HENRIQUES, A. M.; FARIAS, F. M. C.; ALBUQUERQUE, M. G.; PINHEIRO, S. Molecular modeling of a phenyl-amidine class of NMDA receptor antagonists and the rational design of new triazolyl-amidine derivatives. **Chemical Biology Drug Design**, v.81, n. 12, p.198-207, 2013.

ADDLA D, JALLAPALLY A, GURRAM D, YOGEE SWARI P, SRIRAM D, KANTEVARI S. Design, synthesis and evaluation of 1,2,3-triazole-adamantylacetamide hybrids as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.24, n.8, p.1974-9, 2014.

AGUSTINHO, D.P.; MILLER, L.C.; LI, L.X.; DOERING, T.L. Peeling the onion: the outer layers of Cryptococcus neoformans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113, n.7, p.180040, 2018.

ALBERKUME, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; PETRIKKOU, E.; MELLADO, E.; MONZÓN, A.; RODRIGUES-TUDELA, J.L.; NETWORK, E. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.719-722, 2002.

ALI, R.; SIDDIQUI, N. New benzo[d]thiazol-2-yl-aminoacetamides as potential anticonvulsants: synthesis, activity and prediction of molecular properties. **Archiv der Pharmazie**, v.348, n.4, p.254-65, 2015.

ÁLVAREZ, G.; VARELA, J.; CRUCES, E.; FERNÁNDEZ, M.; GABAY, M.; LEAL, S.M.; ESCOBAR, P.; SANABRIA, L.; SERNA, E.; TORRES, S.; FIGUEREDO-THIEL, S.J.; YALUFF, G.; VERA DE BILBAO, N.I.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Identification of a New Amide-Containing Thiazole as a Drug Candidate for Treatment of Chagas' Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1398-1404, 2015.

ANDERSON, T.M.; CLAY, M.C.; CIOFFI, A.G.; DIAZ, K.A.; HISAO, G.S.; TUTTLE, M.D.; NIEUWKOOP, A.J.; COMELLAS, G.; MARYUM, N.; WANG, S.; UNO, B.E.; WILDEMAN, E.L.; GONEN, T.; RIENSTRA, C.M.; BURKE, M.D. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v.10, n.5, p.400-6, 2014.

ANTUNES, R.M.P.; Lima, E. O.; Pereira, M. S. V.; Camara, C. A.; Arruda, T. A.; Catão, R. M. R.; Barbosa, T. P.; Nunes, X. P.; Dias, C. S.; Silva, T. M. S.. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.517-24, 2006.

ASCHALE, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. **International Journal of Chem tech Research**, v.4, p.1437-1441, 2012.

AZEVEDO RVDM, RIZZO J, RODRIGUES ML. Virulence Factors as Targets for Anticryptococcal Therapy. **Journal of Fungi**, v.2, n.4, p.29, 2016.

BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Combination antifungal therapy for the treatment of invasive yeast and mold infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, p. 448–456, 2007.

BAHN, Y.S.; JUNG, K.W. Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. **Eukaryotic Cell**, v.12, n.12, p.1564-77, 2013.

BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; MERIGHI, M.; SMITH, R.; NARASIMHAN, G.; LORY, S. MATHEE, K. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. **Plos One**, v.7, n. 3, p.e34067, 2012.

BANKS, I.R.; SPECHT, C.A.; DONLIN, M.J.; GERIK, K.J.; LEVITZ, S.M.; LODGE, J.K. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v.4, n.11, p.1902-12, 2005.

BARDIOT, D.; THEVISSIN, K.; DE BRUCKER, K.; PEETERS, A.; COS, P. TABORDA, C.P.; MCNAUGHTON, M.; MAES, L.; CHALTIN, P.; CAMMUE, B.P. MARCHAND A. 2-(2-oxo-morpholin-3-yl)-acetamide derivatives as broad-spectrum antifungal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, n.3, p.1502-12, 2015.

BASTOS, R.W.; CARNEIRO, H.C.S.; OLIVEIRA, L.V.N.; ROCHA, K.M.; FREITAS, G.J.C.; COSTA, M.C.; MAGALHÃES, T.F.F.; CARVALHO, V.S.D.; ROCHA, C.E.; FERREIRA, G.F.; PAIXÃO, T.A.; MOYRAND, F.; JANBON, G.; SANTOS, D.A. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.1, p.e01179-17, 2017.

BHATTACHARYA S, ESQUIVEL BD, WHITE TC. Overexpression or deletion of ergosterol biosynthesis genes alters doubling time, response to stress agents, and drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **mBio**, v.9, n.4; p.e01291-18, 2018.

BIELSKA, E., SISQUELLA, M.A., ALDEIEG, M. BIRCH, M.; O' DONOGHUE, E.L.; MAY, R.C. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, n.1556, 2018.

BIRHAN, Y.S.; BEKHIT, A.A.; HYMETE, A. Synthesis and antileishmanial evaluation of some 2,3-disubstituted- 4(3*H*)-quinazolinone derivatives. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v.4, p.10, 2014.

BONANO, V.I.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; MIGUEL, D.C.; JONES, S.A.; DODGE, J.A.; ULIANA, S.R.B. Discovery of Synthetic *Leishmania* Inhibitors by Screening of a 2-Arylbenzothiophene Library. **Chemical Biology Drug Design**, v.81, p.658-665, 2014.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p.57, 2017.

BONGOMIN, F.; OLADELE, R.O.; GAGO, S.; MOORE, C.B.; RICHARDSON, M.D. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v.61, n.5, p.290-297, 2018.

BORBA, H.H.L.; STEIMBACH, L.M.; RIVEROS, B.S, TONIN, F.S.; FERREIRA, V.L.; BAGATIM, B.A.Q.; BALAN, G.; PONTAROLO, R.; WIENS, A. Cost-effectiveness of

amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**, v.61, n.10, p.754-763, 2018.

BOSCO-BORGEAT, M. E.; MAZZA, M.; TAVERNA, C. G.; CÓRDOBA, S.; MURISENGO, O. A.; VIVOT, W.; DAVEL, G. Sustitución aminoacídica en la enzima lanosterol 14 α -demetilasa de *Cryptococcus neoformans* involucrada en la resistencia al fluconazol de aislamientos clínicos. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 2, p. 137–142, 2016.

BOSCO-BORGEAT, M.E.; MAZZA, M.; TAVERNA, C.G.; CÓRDOBA, S.; MURISENGO, O.A.; VIVOT, W.; DAVEL, G. Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- α -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates. **Revista Argentina Microbiología**, v.48, n.2, p.137-42, 2016.

BOSE, I.; REESE, A.J.; ORY, J.J.; JANBON, G.; DOERING, T.L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.4, p.655-63, 2003.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; BOEKHOUT, T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genetics and Biology**, v.45, p.400–421, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 264, de 15 de fevereiro de 2020. Altera a Portaria de Consolidação nº 4/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir a doença de Chagas crônica, na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 fev. 2020. p. 97.

BRASIL, P.F; DE FREITAS, J.A; BARRETO, A.L.S; ADADE, C.M; REIS DE SÁ, L. F; CONSTANTINO-TELES, P ; TOLEDO, F.T; DE SOUSA, B. A; GONÇALVES, A.C; ROMANOS, M.T.V; COMASSETO, J.V; DOS SANTOS, A.A; TESSIS, A. C; SOUTO-PADRÓN, T; SOARES, R.M. A, FERREIRA-PEREIRA A. Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi. **Parasitology International**, v. 66, n.2, p. 47-55, 2017.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.32, n.6, p. 727-34, 2011.

BRIZENDINE, K.D.; BADDLEY, J.W.; PAPPAS, P.G. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. **PLoS One**, v.8, n.3, p.e60431, 2013.

BRUNKE S, MOGAVERO S, KASPER L, HUBE B. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v.32, p.89-95, 2016.

BUTTS, A.; PALMER, G. E.; ROGERS, P. D. Antifungal adjuvants: Preserving and extending the antifungal arsenal. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 198–210, 2017.

CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Cryptococcal traits mediating adherence to biotic and abiotic surfaces. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 88, 2018.

CAMPUZANO, A.; WORMLEY, F.L. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. **Journal of fungi**, v.4, n.1, p.33, 2018.

CASADEVALL, A.; COELHO, C.; ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-Mediated Host Damage. **Frontiers in immunology**, v.9, p.1-8, 2018.

CHANG YL, YU SJ, HEITMAN J, WELLINGTON M, CHEN YL. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v.8, n.2, p.222-236, 2017.

CHANG, M.; SIONOV, E.; KHANAL LAMICHHANE, A.; KWON-CHUNG, K.J.; CHANG, Y.C. Roles of Three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Efflux Pump-Coding Genes in Response to Drug Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.4, p.e01751-17, 2018.

CHOW, E.W.; CLANCEY, S.A.; BILLMYRE, R.B.; AVERETTE, A.F.; GRANEK, J.A.; MIECZKOWSKI, P.; CARDENAS, M.E.; HEITMAN J. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v.13, n.4, p.e1006667, 2017.

CHUN, C.D.; MADHANI, H.D. Applying genetics and molecular biology to the study of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Methods Enzymology**, v.470, p.797–831, 2010.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, 1991. p. 739-787.

CLEVELAND, K. O.; GELFAND, M. S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient. **QJM: An International Journal of Medicine**, v.106, n.4,p. 361-2, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard**, CLSI document M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical and Laboratory Standards, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard**. CLSI document M27-A3. Pennsylvania, United States of America Clinical an Laboratory Standards Institute; 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, CLSI document M07-A8. 8th. Wayne. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

COELHO C, BOCCA AL, CASADEVALL A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v.87:p.1-41, 2014.

COIMBRA, E.S.; ANTINARELLI, L.M.R.; SILVA, A.D.; BISPO, M.L.F.; KAISER, C.R.; DE SOUZA, M.V.N. 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: a promising and potent class of antileishmanial compounds. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v.81, p.658-665, 2013.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE - Guidelines in cryptococcosis - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

CORDERO, R.J.B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. 2020. Melanization in *Cryptococcus neoformans* requires complex regulation. *mBio*, n.11, p.03313-19, 2020.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272- 278, 2005.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.O.; PITANGUI, N.S.; DE OLIVEIRA, H.C.; SCORZONI, L.; GALEANE, M.C.; MEDINA-ALARCÓN, K.P.; MELO, W.C.M.A.; MARCELINO, M.Y.; BRAZ, J.D.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**,v.3, n.2, p.1-24, 2017.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy - what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854–860, 2004.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. London: Churchill Livingstone, 2001.

DE AZAMBUJA, A. Z.; WISSMANN NETO, G.; WATTE, G.; ANTONIOLLI, L.;GOLDANI, L. Cryptococcal Meningitis: A Retrospective Cohort of a Brazilian Reference Hospital in the Post-HAART Era of Universal Access. The **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, p. 6512468, 2018.

DE MELLO, T.P.; DE SOUZA RAMOS, L.; BRAGA-SILVA, L.A.; BRANQUINHA, M.H.; DOS SANTOS, A.L. Fungal Biofilm - A Real Obstacle against an Efficient Therapy: Lessons from Candida. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2017.

DEEKS, S.G.; OVERBAUGH, J.; PHILLIPS, A.; BUCHBINDER,S. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p.15035, 2015.

DEWAR, M. J. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 3902-39091, 1985.

ECKERMAN C, MATTHES B, NIMTZ M, REISER V, LEDERER B, BOGER P, SCHRODER P.Covalent binding of chloroacetamide herbicides to the active site cysteine of plant type III polyketide synthases. **Phytochemistry**, v.64, n.6, p.1045-54, 2003.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. **Antimicrobial combinations, In: Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Williams & Wikins, 1991, p. 434–441.

ELSEGEINY, W.; MARR, K.A.; WILLIAMSON, P.R. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. **Frontiers in Immunology**, v.9, p.651, 2018.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area (PSA) as a sum on fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.43, n.1, p.3714-3717, 2000.

ERWIG, L. P.; GOW, N.A.R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163-176, 2016.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

FARSHORIA, N. N.; BANDAYA, M. R.; AHMADB, A.; KHANB, A. U.; RAUF, A. Synthesis, characterization, and in vitro antimicrobial activities of 5 alkenyl/hydroxyalkenyl-2 phenylamine-1,3,4-oxadiazoles and thiadiazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 6, p. 1933–1938, 2010.

FAVALESSA, O.C.; DE PAULA, D.A.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; TADANO, T.; LAZERA MDOS, S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; WALDEREZ SZESZS, M.; SILVA, D.; HAHN, R.C. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n. 8, p.1037-43, 2014.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, T. B.; SILVA, D. F.; FERREIRA, P. B.; MELO, T. R. *In Silico* and *In Vitro* Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum* **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.18, n.25, 2186-2196, 2018.

FIRACATIVE, C.; LIZARAZO, J.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; CASTANEDA, E. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113, n. 7, p. e170554, 2018.

FOX, D.S.; CRUZ, M.C.; SAI, R.A.; KE, H.; COX, G.M.; CARDENAS, M.E. HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.39, n.4, p.835-49, 2001.

FOX, D.S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **Bioessays**, v.24, n.10, p.894-903, 2002.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, 2014.

FROST, D. J. BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.

FUENTEFRÍA, A.M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D.F.; DONATO, K.K.; DE ANDRADE, S.F. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v.66, n.1, p.2-13, 2018.

GAGO, S.; SERRANO, C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUESTA, I.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; ALLER, A.I.; GÓMEZ-LÓPEZ, A.; MELLADO, E. Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. **Mycoses**, v.60, n.1, p.40-50, 2017.

GELLIS, A.; DUMÈTRE, A.; LANZADA, G.; HUTTER, S.; OLLIVIER, E.; VANELLE, P.; AZAS, N. Preparation and antiprotozoal evaluation of promising β -carboline alkaloids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.66, p.339-347, 2012.

GEORGIEV, L.; CHOCHKOVA, M.; IVANOVA, G.; NAJDENSKI, H.; NINOVA, M.; MILKOVA, T. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. **Riv. Ital. Sost. Grasse**, **2012**, v.89 (2): pp. 91-101.

GLAZIER, V.E.; PANEPINTO J.C. The ER stress response and host temperature adaptation in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v.5, n.2, p.351-6, 2014.

GLOMB, M. A.; PFAHLER, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. **Journal of Biological. Chemistry**., v. 276: p. 41638–41647, 2001.

GODINHO R.M.C.; OLIVEIRA, D. L.; ALBUQUERQUE, P.C.; DUTRA, F.F.; ALMEIDA- PAES, R.; RODRIGUES, M.L.; FONSECA, F.L. *Cryptococcus* and Cryptococcosis. In: Mora-Montes H., Lopes-Bezerra L. (eds) **Current Progress in Medical Mycology**. Springer, 2017.

GÓMEZ-PÉREZ, V.; MANZANO, J. I. ; GARCÍA-HERNANDÉZ, R.; CASTANYS, S.; ROSA, J.M.C.; GAMARRO, F. 4-Amino bis-pyridinium derivatives as novel antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.58, p.4103-4112, 2014.

GOW, N.A.R.; LATGE, J.P.; MUNRO, C.A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiology spectrum**, v.5, n.3, p.1-25, 2017.

GROSSMAN; N.T.; CASADEVALL, A. Physiological differences in *Cryptococcus neoformans* strains *in vitro* versus *in vivo* and their effects on antifungal susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, n.3, p.1–33, 2017.

GULLO, F. P.; ROSSI, S. A.; SARDI, J. C.; TEODORO, V. L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377-91, 2013.

GUPTA, A.; ANIYERY, R. B.; PATHAK, A. In silico pharmacological and in vitro biological study of novel organotin sorbate. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.8,n.10, p.4201-4212, 2017.

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

HAFIDH, R.R.; ABDULAMIR, A.S.; VERN, L. S.; 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**, v. 5, p. 96–106. 2011.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. S37–S41, 1998.

HEISS, C.; KLUTTS, J.S.; WANG, Z.; DOERING, T.L.; AZADI, P. The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains beta-D-glucuronic acid. **Carbohydrate Research**, v.344, n.7, p.915-20, 2009.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HEUNG, L.J. Innate immune responses to cryptococcus. **Journal of fungi**, v.3, n.3, p.35, 2017.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L. SANCHES, D.A.G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing, an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

JOSEPH-HORNE, T.; LOEFFLER, R.; HOLLOMON, D.; KELLY, S. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.34, n.3, p.223–225, 1996.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v.20, n.19, p.5678-5698, 2012.

KATKE, S.A.; AMRUTKAR, S.V.; BHOR,R.J.; KHAIRNAR, M.V. Synthesis of biologically active 2-chloro-*n*-alkyl/aryl acetamide derivatives. **International Journal of Pharma Sciences and Research** v..2, n.7, p. 148-156, 2011.

KARATA, F.; CANSIZ, A.; KARA, H.; KARATEPE, M.; KOPARIR, M. Synthesis of Two New Acetanilide Derivatives and Their Effect on the Serum Antioxidant Vitamins (A, E, and C) and the MDA Level in Rats. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.31, p.499-501, 2005.

KARIER, P.; KRAUS, G.; KOLBER, I. Metazachlor traces in the main drinking water reservoir in Luxembourg: a scientific and political discussion. **Environmental Sciences Europe**, v.29, n.1, p.25, 2017.

KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A.J.; BALDWIN, B.C.; POWDERLY, W.G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8-->7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiology Letters**, v.122, n.1 , p.39-42, 1994.

KENNEDY JR, G.L. Biological effects of acetamide, formamide, and their mono and dimethyl derivatives: na update. **Critical Reviews in Toxicology**, v.31, n.2, p.139-222, 2001

KHATKAR, A.; NANDA, A.; KUMAR, P.; NARASIMHAN, B. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of p-coumaric acid derivatives. *Arab. J. Chem.* **2014**, no prelo.

KHURANA, N. I.; MOHAN, P. S.; GAJBHIYE, A.; GOEL, R. K. Pass assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. **European journal of Pharmacology**, v.662, n.1, p.22-30, 2011.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A.O.; KRONSTAD, J.W.; BARTLETT, K.H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 5, p. 1433-1443, 2007.

KLEPSE, M.E.; ERNST, E.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1387-1391, 1998.

KONDA, R.K.; NUTHAKKI, V.K.; NAGARJUNA, R. Synthesis, Characterization and Pharmacological Screening of Substituted Sulphonamide Derivatives . **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v.3, 344-349., 2014.

KOZUBOWSKI, L; HEITMAN, J. Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v.75, n.3, p.658-75.

KUMAR, R.; JAIN, S.; JAIN, N. Synthesis and evaluation of acetaminophen derivatives as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents. **Der Pharma Chemica**, v.5, n.3, p. 73-78, 2013.

KUNG, P. P.; HUANG, B. W.; ZHANG, G. ; ZHOU, J. Z.; WANG, J.; DIGITS, J. A.; SKAPTASON, J.; YAMAZAKI, S.; NEUL, D.; ZIENTEK, M.; ELLERAAS, J.; MEHTA, P.; YIN, M. J.; HICKEY, M. J.; GAJIWALA, K. S.; RODGERS, C.; DAVIES, J. F.; GEHRING, M. R. Dihydroxyphenylisoindoline Amides as Orally Bioavailable Inhibitors of the Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Molecular Chaperone. **Journal of Medicinal Chemistry**., v. 53: p. 499–503, 2010.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v.6, p.574– 587, 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z. A.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y.-S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

KWON-CHUNG, K.J; BENNETT, J.E; WICKES, B.L; MEYER, W; CUOMO C.A, WOLLENBURG, K.R; BICANIC, T.A; CASTAÑEDA, E; CHANG Y.C; CHEN, J; COGLIATI, M; DROMER, F; ELLIS, D; FILLER, S.G; FISHER, M.C; HARRISON, T.S; HOLLAND, S.M; KOHNO, S; KRONSTAD, J.W; LAZERA, M; LEVITZ, S.M; LIONAKIS, M.S; MAY, R.C; NGAMSKULRONGROJ, P; PAPPAS, P.G; PERFECT, J.R; RICKERTS, V; SORRELL, T.C; WALSH T.J; WILLIAMSON, P.R; XU, J; ZELAZNY, A.M; CASADEVALL, A. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **mSphere**., v. 2, n.1 p. 357-16, 2017.

LAI, C. C.; TAN, C. K.; HUANG, Y. T.; SHAO, P. L.; HSUEH, PR. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, p. 77-85, 2008.

LAVORATO, S.N.; DUARTE, M.C.; DE ANDRADE, P.H.R.; COELHO, E.A.F.; ALVES R.J. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro- N -arylacetamides. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.53, n.1, e16067, 2017.

LEACH, M.D.; COWEN, L.E. Surviving the heat of the moment: a fungal pathogens perspective". **PLoS Pathogens**, v. 9, n.3, p. 100-103, 2013.

LEE, D.; JANG, E.H.; LEE, M.; KIM, S.W.; LEE, Y.; LEE, K.T.; BAHN, Y.S. Unraveling Melanin Biosynthesis and Signaling Networks in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 10, n.5, p.02267-19, 2019.

LEV, S.; DESMARINI, D.; CHAYAKULKEEREE, M.; SORRELL, T.C.; DJORDJEVIC, J.T. The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. **PLoS One**, v.7, n.12, p. e51403, 2012.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, 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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.401–416, 2009.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today Technology**, v.1, n.4, p.337-341, 2004.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; HARRIS, J. R.; GROSSMAN, N. T.; DEBESS, E.; WOHRLE, R.; MARSDEN- HAUG; VUGIA, D. J. *Cryptococcus gattii* in the United States: genotypic diversity of human and veterinary isolates. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74737, 2013.

LOPES, W.; VAINSTEIN, M.H.; DE SOUSA ARAUJO, G.R.; FRASES, S.; STAATS C.C.; DE ALMEIDA, R.M.C.; SCHRANK, A.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M.H. Geometrical Distribution of *Cryptococcus neoformans* Mediates Flower-Like Biofilm Development. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.2534, 2017.

LOYSE, A.; THANGARAJ, H.; EASTERBROOK, P.; FORD, N.; ROY, M.; CHILLER, T.; GOVENDER, N.; HARRISON, T.S.; BICANIC, T. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **Lancet Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.629-37, 2013.

MA, H.; MAY, R.C. **Chapter 5 Virulence in Cryptococcus Species**. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 131–190, 2009.

MACHADO, P.A.; HILÁRIO, F.F.; CARVALHO, L.O.; SILVEIRA, M.L.T.; ALVES, R.B.; FREITAS, R.P.; COIMBRA, E.S. Effect of 3-Alkylpyridine marine alkaloid analogues in *Leishmania* species related to American cutaneous Leishmaniasis. **Chemical Biology Drug Design**, v.80, p.745-751, 2012.

MACHADO, G.D.R.M.; FERNANDES DE ANDRADE, S.; PIPPI, B.; BERGAMO, V.Z.; JACOBUS BERLITZ, S.; LOPES, W.; LAVORATO, S.N.; CLEMES, KÜLKAMP GUERREIRO, I.; VAINSTEIN, M.H.; TEIXEIRA, M.L.; ALVES, R.J.; FUENTEFRIA, A.M. Chloroacetamide derivatives as a promising topical treatment for fungal skin infections. **Mycologia**, v.11, n.4, p.612-623, 2019.

MAENG, S.; KO, Y.J.; KIM, G.B.; JUNG, K.W., FLOYD, A.; HEITMAN, J.; BAHN, Y.S. Comparative transcriptome analysis reveals novel roles of the Ras and cyclic AMP signaling

pathways in environmental stress response and antifungal drug sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v.9, n.3, p.360-78, 2010.

MASHELKAR, U. C.; MUKESH, J.H.A; MASHELKAR, B. Synthesis of 2-azetidinones substituted quinoline derivative. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.77, p.1-10, 2012.

MAY, J.; CHAN, C.H.; KING, A.; WILLIAMS, L.; FRENCH, G.L. Time kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal Antimicrobial Chemistry**, v. 45, p. 639-643, 2000.

MAY, R. C.; STONE, N. R.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

MAYER, F.L.; KRONSTAD, J.W. *Cryptococcus neoformans*. **Trends in microbiology**, v.28., n.2, p.163-164, 2020.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v.30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MELETIADIS, J.; ANTACHOPOULOS, C.; STERGIOPOULOU, T.; POURNARAS, S.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Differential Fungicidal Activities of Amphotericin B and Voriconazole against *Aspergillus* Species Determined by Microbroth Methodology. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 9, 2007.

MESA-ARANGO, A.C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ARGÜELLES, J.C.; PLA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. The production of reactive oxygen species is an universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug: AMPHORES study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.11, p. 6627-38, 2014.

MILLER, M.F.; MITCHELL, T.G. Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. **Infection and Immunity** v.59, n.1, pp. 24–28, 1991.

MONK, B. C.; GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 367-369, 2008.

MONTEIRO- NETO, V.; SOUZA, C. D.; GONZAGA, L. F.; SILVEIRA, B. C.; SOUSA, N. C. F.; PONTES, J. P.; SANTOS, D. S.; MARTINS, W. C.; PESSOA, J. F. V.; CARVALHO-JÚNIOR, A.R.; ALMEIDA, V. S. S.; OLIVEIRA, N. M. T.; ARAUJO, T. S.; FERREIRA, D. M.; MENDES, S. J .F.; FERRO, T. A. F.; FERNANDES, E. S. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Plos one** v.15,n.5, p.e0232987, 2020.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163 – 194, 2005.

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.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS –NCCLS (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Villanova, NCCLS, v. 17, n. 9 (Document M27-A2).

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

NEGRONI, R. “ Cryptococcosis”. **Clinics in Dermatology**, v.30,n.6, p.599-609, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, n. 3, p.629-61, 2016.

NOSANCHUK, J.D.; STARK, R.E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1463, 2015.

NYAZIKA, T. K.; TATUENE, J. K.; KENFAK-FOGUENA, A.; VERWEIJ, P. E.; MEIS J.F; ROBERTSON, V.J; HAGEN, F. Epidemiology and aetiologies of cryptococcal meningitis in Africa, 1950-2017: protocol for a systematic review. **British Medical Journal Open** v.8, n. 7, p. e020654, 2018.

ODEGBEMI, O.B., DADA-ADEGBOLA, H.O., ADEOYE, I.A.; FAYEMIWO, S.A. Epidemiology of Cryptococcal antigenemia among HIV infected patients in southwestern Nigeria. **Global Biosecurity**, v.1, n.3, 2019.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.;HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO Journal**, v.16, n.10, p. 2576-89, 1997.

OLIVEIRA, C. S.; LIRA, B. F.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-staphylococcal Activity of N-Acylhydrazones and New 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. **Molecules**, v. 17, p. 5095-5107, 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PADDER, S.A.; PRASAD, R.; SHAH, A.H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. **Microbiological Research**, v.210, p.51-58, 2018.

PADLA, E. P.; SOLIS, L.T.; RAGASA, C. Y. Antibacterial and antifungal properties of *ent* – kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 5, p. 408–414, 2012.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**; v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PATTAN, S.R.; ALI, M.S.; PATTAN, J.S.; PUROHIT, S.S.; REDDY, V.V.K.; NATARAJ, B.R. Synthesis and microbiological evaluation of 2-acetanilido-4-arylthiazole derivatives. **Indian Journal of Chemistry**, 54 B, p.1929-1932, 2006.

PAZARE, A. R. Cryptococcosis: The Ubiquitous Yeast. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 64, p. 11-13, 2016.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B. ; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.1, p.233-242, 2011.

PERFECT, J.R.; DISMUKES, W.E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D.L.; GRAYBILL, J.R; HAMILL, R.J.; HARRISSON, T.S.; LARSEN, R.A.; NGUYEN, M.H.; PAPPAS, P.G.; POWDERLY, W.G.; SINGH, N.; SOLBEL, J.D.; SORRELL, T.C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50 n.3,p. 291-322, 2010.

PERFECT, J.R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49-54, 2015.

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. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268-280, 2004.

PIROFSKI, L; CASADEVALL, A. What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? **BMC Immunology**, v.16, n.13, 2015.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; LA SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Molecular Microbiology**, v.47, n. 2, p. 357-71, 2003.

RAJASINGHAM R, SMITH RM, PARK BJ, JARVIS JN, GOVENDER NP, CHILLER TM, DENNING, D.W; LOYSE, A.; BOULWARE, D.R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**., v. 17, n.8, 873-81, 2017.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p.1-14, 2012

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S.M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.

REFAT, M.S; MOHAMED, G.G; EL-SAYED, M.Y; KILLA, M.A; FETOOH, H. Spectroscopic and thermal degradation behavior of Mg(II), Ca(II), Ba(II) and Sr(II) complexes with paracetamol drug. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, n.2, p-2376-2387, 2017.

RODERO, L.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ, A.C.; SALVE, A.; GUELFAND, L.; CAHN, P.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DAVEL, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n.11, p.3653-6, 2003.

ROY, A.; DUMBARE, D.R.; HARAK, S.S.; NAJEEB, M.Z.M.; DESHMUKH, R.D. Synthesis Molecular Docking Studies and Biological Evaluation of 5-[4-(substituted) benzylidene or benzyl] Thiazolidine-2, 4-one with their Oral Hypoglycemic Activity. **International Research Journal of Pharmacy**, v.4, p.151-157, 2013.

RUIDER, S.; MAULIDE, N. Strong bonds made weak: towards the general utility of amides as synthetic modules. **Angewandte Chemie**, v.54, n. 47, p. 13856-13858, 2015.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. Vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

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 (C₉H₁₀N₄O₄). **EXCLI Journal**, Dortmund, v. 13, p. 1022-1028, 2014.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; PARKINSON, T; FALCONE, D.; BILLE, J. Candida albicans mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n. 8, p.2404-12, 2003.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**, v.9, n. 7, p.1029-50, 2009.

SANGUINETTI M, POSTERARO B, LA SORDA M, TORELLI R, FIORI B, SANTANGELO R, DELOGU G, FADDA G. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v.74, n.2, p.1352-9, 2006.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.

SANTOS, A. L. S.; DE MELLO, T. P.; RAMOS, L. de S.; BRANQUINHA, M. H. Biofilm: A Robust and Efficient Barrier to Antifungal Chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 01, n. 01, 2015.

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**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SEGAL, B. H.; STEINBACH, W. J. Combination antifungals: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, p. 883–892, 2007.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n.2,p. 213-67, 2011.

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

SINGH, R.K; KUMAR, A.; MISHRA, A.K. Chemistry and Pharmacology of Acetanilide Derivatives: A Mini Review. **Letters in Organic Chemistry**, v.16, n.1, p.6-15, 2018.

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*. v.36, n.2, p.288-305, 2012.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; DOLAN, M. A.; GHANNOUM, M. A.; KWON-CHUNG, K. J. Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1162-9, 2012.

SIONOV, E.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n.10, p. 5127-30, 2013.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 118-122, 2001.

SPADARI, C.C.; WIRTH, F.; LOPES, L.B.; ISHIDA, K. New Approaches for Cryptococcosis Treatment. **Microorganisms**, v.8, n.4, p.613, 2020.

SQUIZANI, E.D.; OLIVEIRA, N.K.; REUWSAAT, J.C.V.; MARQUES, B.M.; LOPES, W.; GERBER AL, DE VASCONCELOS, A.T.R.; LEV,S.; DJORDJEVIC, J,T. SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.;STAATS, C.C.; KMETZSCH, L. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cellular Microbiology**, v.20, n.2, 2018.

SRIKANTH, J.; SANDEEP, T.; DIVYA, K.; GOVINDARAJAN, R. Screening of In -vitro Anti-Inflammatory Activity of Some Newly Synthesized 1,3-Thiazine Derivatives . **International Journal of Pharmaceutical Chemistry Research**, v. 3, p.213-220, 2013.

STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. **PLoS One**, v. 7, n.11, p.494-02, 2012.

SUMMERS, D.K.; PERRY, D.S.; RAO, B.; MADHANI, H.D. Coordinate genomic association of transcription factors controlled by an imported quorum sensing peptide in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v.16, n.9, p. e1008744, 2020.

TSENG, H. K.; HUANG, T. Y.; WU, A. Y.; CHEN, H. H.; LIU, C. P.; JONG, A. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiology**, v. 10, p. 1669-82, 2015.

UNAIDS. RELATÓRIO INFORMATIVO – ATUALIZAÇÃO Global da AIDS 2019. UNAIDS, 2019. Disponível em: <https://unaids.org.br/tag/relatorio-global-2019/> Acesso: 17.12.2020

URSU, O.; OPREA, T. I. Model-Free Drug-likeness from fragments. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.50, n.8, p.1387-1394, 2010.

URSU, O.; RAYAN, A.; GOLDBLUM, A.; OPREA, T. I. Understanding drug-likeness. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v.1, n.5, p.760-781, 2011.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v.12, p.687-713, 2012.

VAN WYK, M.; GOVENDER, N.P.; MITCHELL, T.G.; LITVINTSEVA, A.P.; GERMS, S.A. Multilocus sequence typing of serially collected isolates of *Cryptococcus* from HIV-infected patients in South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, n. 6, p.1921-31, 2014.

VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; KENNO, S.; PERITO, S.; CENCI, E.; MONARI, C. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiology**, v.8, n.9, p.1107-16, 2013.

VERMA, A. K.; MARTIN, A; SINGH, A. K. Synthesis, Characterization and evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic activity of Benzothiazole derivatives. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, 2, p.84-89, 2014.

WAN, R.; ZHANG, J.Q.; HAN, F.; WANG, P.; YU, P.; HE, Q. Synthesis and insecticidal activities of novel 1,3,4-thiadiazole 5-fluorouracil acetamides derivatives: an RNA interference insecticide. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v.30, n.4, p.280-92, 2011.

WANG, P.; CARDENAS, M.E.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **European Molecular Biology Organization Reports**, v.2, n.6, p.511-8, 2001.

WHITE, R.; BURGESS, D.S.; MADHAMAVIMANDURU, B.J.A. Comparison of three different in vitro methods of detection synergism: time-kill, checkerboard and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1914-1918, 1996.

XIE, J. L.; POLVIL, E. J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future microbiology**, v.9 n.4, p. 523–42, 2014.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M.L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v.68, p.133-216, 2009.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, 10, n. 1, p. 490-501, 2019.

ZAVALA, S.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine** v. 41, n.1, p. 69-79, 2020.

ANEXO A

Espectro Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear

Figura A1. Espectro de FTIR (ATR) da 2-bromo-*N*-fenilacetamida.

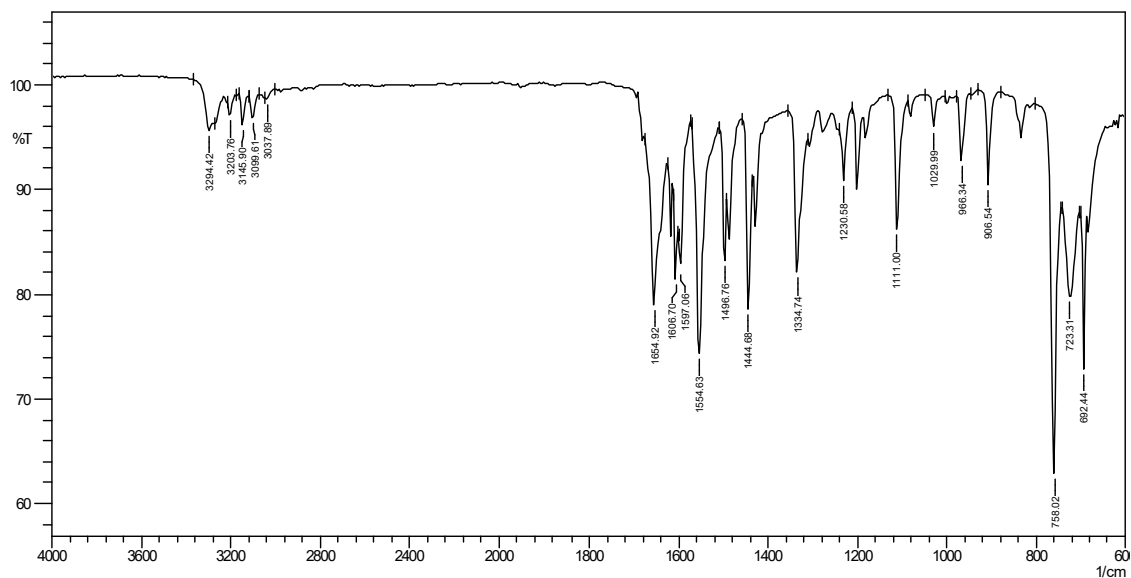


Figura A2. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da 2-bromo-*N*-fenilacetamida

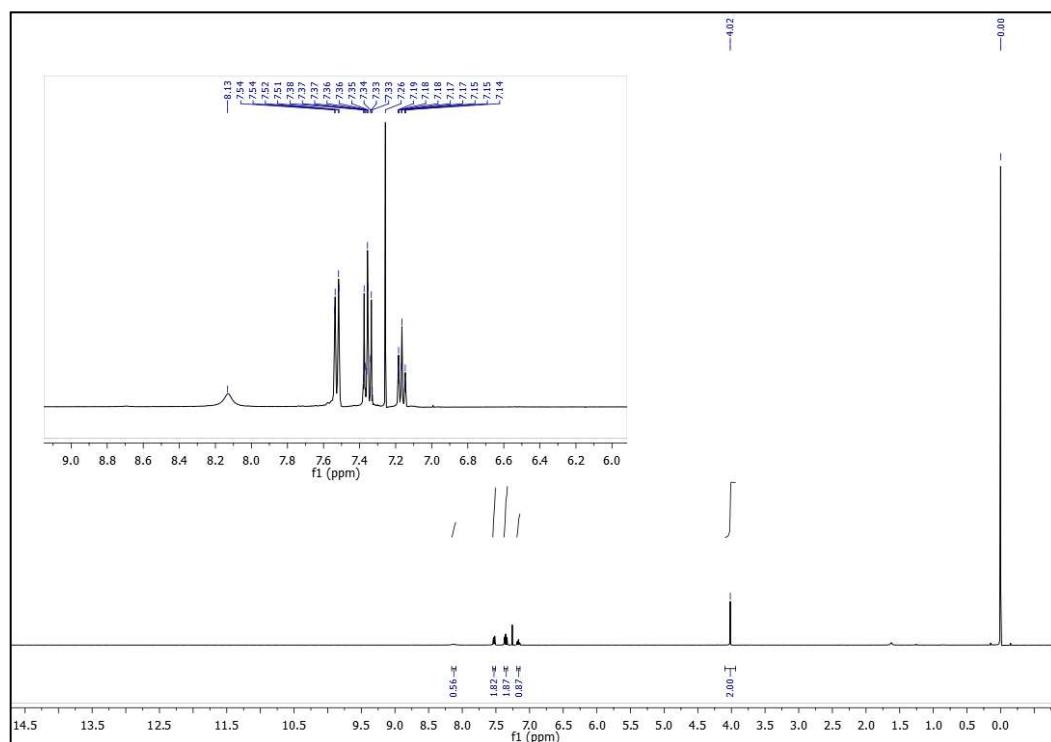
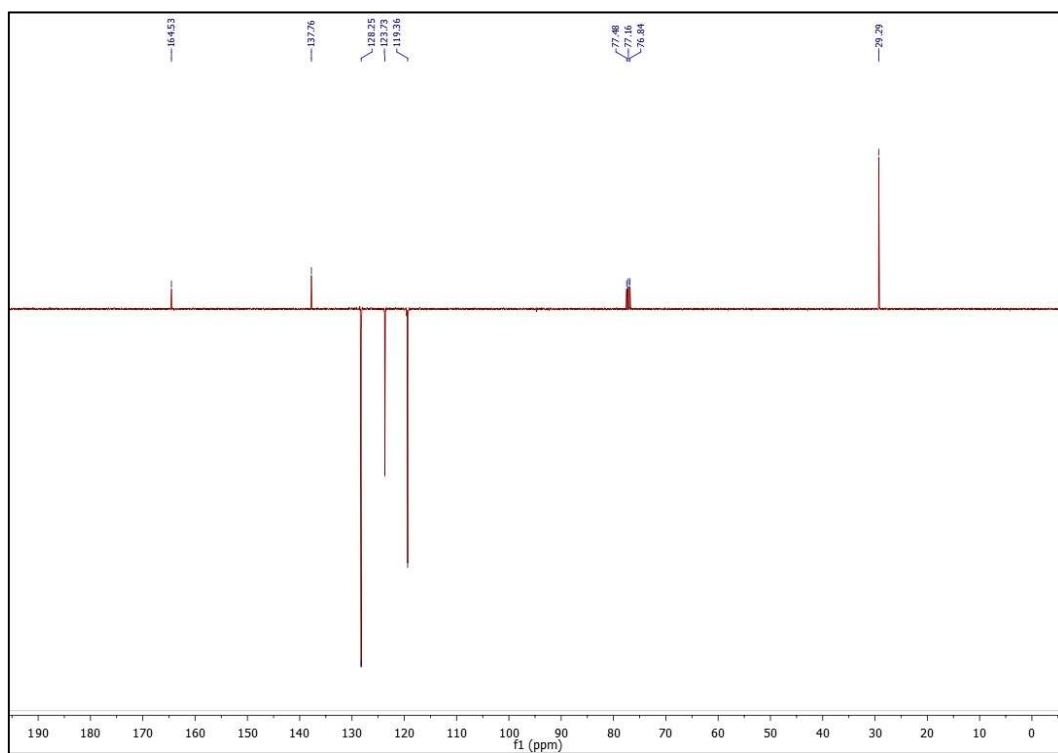


Figura A3. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 101 MHz) da 2-bromo-*N*-fenilacetamida.



ANEXO B**Parecer Consubstanciado do CEP**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

Pesquisador: ALESON PEREIRA DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20419319.5.0000.5181

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.653.358

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

Inúmeras doenças microbianas de origens bacteriana, viral ou fúngica são relatadas na literatura. Em muitos casos, os responsáveis pelas infecções adquirem resistência ao medicamento utilizado, e por isso grande número de antimicrobianos tem sido desenvolvido pela indústria farmacêutica (KUBO et al., 1993; KOSHI; CHERIAN, 1995; DEUS et al., 2011).

Para que um produto, seja ele natural ou sintético, venha se tornar um medicamento seguro e eficaz, é necessário a realização de estudos toxicológicos para determinação de padrões de segurança que devem ser determinados antes da utilização do medicamento na clínica. Dessa forma, o estudo da toxicologia de um produto é de grande valia, pois permite a caracterização dos efeitos deletérios das drogas ocorridos a partir da sua administração, contribuindo para decidir se um produto deve ser adotado ou não para uso clínico (SARAIVA et al., 2012).

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade in vitro é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas objetivando estimar o dano que elas podem produzir in vivo em eritrócitos do organismo (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005).

A genotoxicidade é a área da genética que estuda os efeitos de determinadas substâncias sobre a

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N
Bairro: Belo Horizonte **CEP:** 58.704-000
UF: PB **Município:** PATOS
Telefone: (83)3421-7300 **Fax:** (83)3421-4047 **E-mail:** cep@fiponline.edu.br

estrutura do DNA, que pode resultar em um processo denominado mutagênese. Neste sentido, os agentes que alteram a sequência do DNA são considerados “tóxicos” para os genes e são, então, chamados de genotóxicos (SILVA et al., 2003). Assim, as pesquisas sobre genotoxicidade podem também comprovar o efeito anticarcinogênico de algumas substâncias (PAOLINI, 2003).

Dessa forma, este projeto objetiva-se avaliar o potencial antimicrobiano e citotóxico das amidas sintéticas N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N- fenilacetamida, 2-cloroN-fenilacetamida; híbridos moleculares do Triclosan: (5-cloro-2-(2,4- iclorofenoxi)fenil-2- acetoxibenzoato, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(3-benzoilfenil)propanoato, 5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(4-obutifenil)propanoato); os isômeros R - (+)--citronelol e S - (-) -citronelol, dos óleos essenciais de Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Lúpulo Columbus, extratos de Hordeum vulgare, Spondias mombin, Tracheophyta e Urtica dioica L. e os flavonoides Vitexina, Tilirosideo e Trimetoxiflavona, para contribuir com a descoberta de novas drogas com potencial farmacológico promissor.

HIPÓTESES

As substâncias em estudo possuem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse clínico desse estudo, bem como possuem atividade antioxidante e toxicidade reduzida. As atividades biológicas envolvendo as substâncias em estudo não foram ainda investigadas detalhadamente em relação à sua capacidade antibacteriana e antifúngica. Este trabalho propõe-se a investigar a hipótese de que estas substâncias podem desempenhar ação antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse clínico. Também será testada a hipótese de que estas substâncias isoladas apresentem efeito oxidante, hemolítico e potencial mutagênico reduzido.

METODOLOGIA

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antibacteriana serão realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / João Pessoa - PB, sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima. Os microorganismos utilizados nos ensaios serão isolados, identificadas quanto à espécie e analisados sobre os seus perfis de resistência antibiótica.

Os ensaios toxicológicos e da avaliação da atividade antioxidante das substâncias serão realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N		CEP: 58.704-000
Bairro: Belo Horizonte		
UF: PB	Município: PATOS	
Telefone: (83)3421-7300	Fax: (83)3421-4047	E-mail: cep@fiponline.edu.br

Grande (UFCG) / Patos – PB, sob coordenação do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o potencial antimicrobiano e a toxicidade in vitro das amidas sintéticas N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-fenilacetamida, 2-cloro-N-fenilacetamida; híbridos moleculares do Triclosan: (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2-cetoxibenzoato, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(3-benzoilfenil)propanoato, 5-cloro-2-(2,4-iclorofenoxi)fenil-2-(4-isobutifenil)propanoato); os isômeros R - (+)--citronelol e S - (-)-citronelol, dos óleos essenciais de Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Lúpulo Columbus, extratos de Hordeum vulgare, Spondias mombin, Tracheophyta e Urtica dioica L. e os flavonoides Vitexina, Tilirosídeo e Trimetoxiflavona.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e os benefícios foram descritos conforme a Resolução 466/2012 do CNS/MS.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifica-se direcionamento metodológico adequado à realização de um trabalho com relevância acadêmica, científica e social.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos foram apresentados de acordo com a Norma Operacional 001/2013 do CNS/MS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Cumpridas as pendências lançadas no parecer anterior, nos posicionamos de maneira FAVORÁVEL à realização do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este documento tem validade de CERTIDÃO DE APROVAÇÃO para coleta dos dados propostos ao estudo. Destacamos que a CERTIDÃO PARA PUBLICAÇÃO só será emitida após o envio do RELATÓRIO FINAL do estudo proposto, via Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_144908	14/10/2019		Aceito

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N

Bairro: Belo Horizonte

CEP: 58.704-000

UF: PB

Município: PATOS

Telefone: (83)3421-7300

Fax: (83)3421-4047

E-mail: cep@fiponline.edu.br



**COMITÉ DE ÉTICA
EM PESQUISA**
FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS

**FACULDADES INTEGRADAS
DE PATOS - FIP**



Continuação do Parecer: 3.653.358

Básicas do Projeto	_E1.pdf	20:53:22		Aceito
Outros	PROJETOEMENDA.pdf	14/10/2019 20:49:58	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Outros	Emenda.pdf	14/10/2019 20:46:41	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/10/2019 17:33:48	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/10/2019 17:33:19	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAUFCG.pdf	09/09/2019 21:12:28	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAUFPB.pdf	09/09/2019 21:12:12	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMOCONFIDENCIALIDADE.pdf	09/09/2019 21:11:36	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOPESQUISADOR.pdf	09/09/2019 21:11:12	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	09/09/2019 21:10:26	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	09/09/2019 21:07:22	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	Scan0080.pdf	05/09/2019 17:45:27	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PATOS, 21 de Outubro de 2019

Assinado por:
Lídia Pinheiro da Nóbrega
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N		CEP: 58.704-000
Bairro: Belo Horizonte		
UF: PB	Município: PATOS	
Telefone: (83)3421-7300	Fax: (83)3421-4047	E-mail: cep@fiponline.edu.br

