



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

HERMES DINIZ NETO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTI-
BIOFILME DE 2-CLORO-N-FENILACETAMIDA SOBRE**
***Candida albicans* E *Candida parapsilosis* RESISTENTES**
AO FLUCONAZOL.

HERMES DINIZ NETO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTI-
BIOFILME DE 2-CLORO-N-FENILACETAMIDA SOBRE
Candida albicans E *Candida parapsilosis* RESISTENTES
AO FLUCONAZOL.**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde e Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacologia

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

COORIENTADOR: Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra

João Pessoa

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D583i Diniz Neto, Hermes.

Investigação da atividade antifúngica e anti-biofilme de 2-cloro-N-fenilacetamida sobre *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* resistentes a fluconazol / Hermes Diniz Neto. - João Pessoa, 2022.
75 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Coorientação: Felipe Queiroga Sarmento Guerra.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Fungicidas. 2. 2-cloro-N-fenilacetamida. 3. Biofilme. 4. *Candida* spp. 5. Resistência antifúngica.
I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Guerra, Felipe Queiroga Sarmento. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.282(043)

HERMES DINIZ NETO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTI-
BIOFILME DE 2-CLORO-N-FENILACETAMIDA SOBRE
Candida albicans E *Candida parapsilosis* RESISTENTES
AO FLUCONAZOL.**

Aprovado em: 21/10/2022

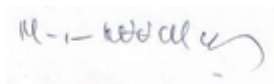
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Edeltrudes de Oliveira
Lima
(Orientadora)



Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento
Guerra
(Coorientador)



Prof.ª. Dr.ª. Margareth De Fatima
Formiga Melo Diniz
(Membro Titular Interno)



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da
Rocha Gomes
(Membro Titular Interno)



Prof. Dr. Rafael de Almeida
Travassos
(Membro Titular Externo)



Prof. Dr. Guilherme Maranhão
Chaves
(Membro Titular Externo à Instituição)

Assim como foi em minha defesa de dissertação, este misto de dedicatória e agradecimento especiais permanece inalterado pois estes pilares nunca ruíram ou ruirão em meu coração:

Aos meus pais, sobretudo à minha mãe **Disneylandia Vieira Diniz**, que constantemente me ensina o significado de amor, cuidado, carinho e perseverança. Que me mostra que é possível trazer e compartilhar energia de renovação para viver quando o mundo parece desolador.

AGRADECIMENTOS

Todo este trabalho não seria possível sem o apoio de pessoas fantásticas que passaram por minha vida durante este período de provas.

O início sequer teria existido se não fosse pela minha excelente orientadora, **Prof^a Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima**, que aceitou continuar me guiando nesta árdua estrada. E durante o caminho talvez eu tivesse fraquejado, não fosse o valoroso apoio do meu fantástico coorientador **Prof Dr Felipe Queiroga Sarmiento Guerra**, que me acompanha desde a graduação e cujo exemplo nunca esquecerei. Duas almas de brilho forte, acolhedor e inspirador, os quais sempre tento e tentarei me espelhar ao longo da minha jornada.

E mesmo que tivesse caminhado muito, não seria capaz de chegar tão longe sem o apoio das seguintes pessoas: **Adolfo Athayde, Alex Santos, Alexane Freyre, Amon Lima, Ana Angélica, Ana Paula Andrade, Anaís Serrano, Anderson Frazão, Cinthya Ponce, Daniela Bomfim, Danilo Cavalcanti, Felipe Cordeiro, Felipe Vieira, Gislaine Schaeffer, Inaê Dandara, Ive Fróes, Jeff Martins, Joana Kästle, Jucymara Lacet, Maria Alice Venâncio, Pablo Gomes de Miranda, Rafael Carlos, Rawny Gouveia, Rayssa Nóbrega, Regina Moraes, Sabrícia Andrade, Stefano Tomei, Thays Carvalho, Victor Batista, Waldir Cavalcanti e Wolfram Filho**. Nunca serei capaz de retribuir todo o suporte recebido em diversos momentos cruciais nesta jornada.

Aos colegas de laboratório, **Daniele de Figueredo, Francisco Patrício Júnior, Givanildo Fernandes, Helivaldo Diógenes, Laísa Vilar, Rafael Farias e Shelygton Lima**. Pelo auxílio incansável em todas as tarefas dentro e fora do laboratório que deram forma ao trabalho realizado nesta pesquisa.

À **secretaria, coordenação e docentes** do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo alto nível de compromisso para com as necessidades dos discentes e incansáveis esforços para garantir um programa de alto nível.

À **Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por fornecer os recursos necessários para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

Resumo

DINIZ NETO, H. ***Investigação da atividade antifúngica e anti-biofilme de 2-cloro-N-fenilacetamida sobre Candida albicans e Candida parapsilosis resistentes a fluconazol.*** 2022. 75p. Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. 2022.

Infecções causadas pelo gênero *Candida*, sobretudo as sistêmicas, representam um desafio para a saúde pública devido à alta morbimortalidade, elevados custos associados e dificuldade de tratamento com bom prognóstico clínico. *Candida albicans* é a mais frequente causadora desta infecção, entretanto, o número de casos provocados por espécies não-albicans como *C. parapsilosis* tem surgido, com notável registro de linhagens resistentes. A busca por novas alternativas terapêuticas se torna um recurso importante no controle destas infecções e o aproveitamento de algumas substâncias já conhecidas, como a 2-cloro-*N*-fenilacetamida, é uma maneira de se obter novos produtos potencialmente eficazes. Diante disto, o potencial antifúngico da 2-cloro-*N*-fenilacetamida foi investigado contra linhagens de *C. albicans* e *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol. A atividade antifúngica da 2-cloro-*N*-fenilacetamida foi avaliada *in vitro* pela determinação da concentração inibitória e fungicida mínima (CIM e CFM), inibição da formação de biofilme e sua ruptura, investigação de provável mecanismo de ação e associação desta molécula com anfotericina B e fluconazol. O produto teste inibiu o crescimento de todas as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com uma CIM variando de 128 a 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e uma CFM de 512 a 1.024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A substância também inibiu até 92% da formação de biofilme e provocou uma ruptura de até 87% do biofilme pré-formado. Porém, a 2-cloro-*N*-fenilacetamida não promoveu atividade antifúngica através da ligação ao ergosterol da membrana celular nem prejudicou a integridade da parede celular do fungo. O antagonismo foi observado ao combinar esta substância com anfotericina B e fluconazol. A substância exibiu efeitos antifúngicos significativos inibindo tanto as células planctônicas quanto o biofilme de cepas resistentes ao fluconazol. Vale salientar que sua combinação com outros antifúngicos deve ser evitada e que ainda resta estabelecer seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: 2-cloro-*N*-fenilacetamida. Biofilme. *Candida* spp. Mecanismo de ação. Resistência antifúngica.

Abstract

DINIZ NETO, H. ***Investigation of the antifungal and anti-biofilm activity of 2-chloro-N-phenylacetamide against fluconazole-resistant Candida albicans and Candida parapsilosis.*** 2022. 75p. Doctor's Degree - Program of Post-Graduation in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paráíba. 2022.

Infections caused by the *Candida* genus, especially systemic ones, represent a challenge for public health due to high morbidity and mortality, high associated costs and difficulty in treatment with a good clinical prognosis. *Candida albicans* is the most frequent cause of this infection, however, the number of cases caused by non-*albicans* species such as *C. parapsilosis* has emerged, with a remarkable record of resistant strains. The search for new therapeutic alternatives becomes an important resource in the control of these infections and the use of some already known substances, such as 2-chloro-*N*-phenylacetamide, is a way to obtain potentially effective new products. Therefore, the antifungal potential of 2-chloro-*N*-phenylacetamide was investigated against fluconazole-resistant *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains. The antifungal activity of 2-chloro-*N*-phenylacetamide was evaluated *in vitro* by the determination of the minimum inhibitory and fungicidal concentrations (MIC and MFC), inhibition of biofilm formation and its rupture, investigation of the possible mechanism of action, and association between this molecule and amphotericin B and fluconazole. The test product inhibited all strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, with a MIC ranging from 128 to 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and a MFC of 512 to 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. It also inhibited up to 92% of biofilm formation and rupture of up to 87% of preformed biofilm. However, 2-chloro-*N*-phenylacetamide did not promote antifungal activity by binding to cell membrane ergosterol, nor did it impair the integrity of the fungal cell wall. Antagonism has been observed when combining this substance with amphotericin B and fluconazole. The substance exhibited significant antifungal effects by inhibiting both planktonic cells and the biofilm of fluconazole-resistant strains. It is worth noting that its combination with other antifungals should be avoided and that its mechanism of action remains to be established.

Keywords: 2-chloro-*N*-phenylacetamide. Antifungal resistance. Biofilm. *Candida* spp. Mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Patogênese da candidíase invasiva	15
Figura 2 – Mecanismos envolvidos na resistência do biofilme de <i>Candida</i> spp	17
Figura 3 – Principais mecanismos de resistência antifúngica em <i>Candida</i> spp	21
Figura 4 – Estrutura química da 2-cloro- <i>N</i> -fenilacetamida	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
LM	Laboratório de Micologia
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption-time-of-flight mass spectrometry</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SAAS	Susceptibilidade Antifúngica em Ágar Semissólido
UFC	Unidades Formadores de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 <i>Candida</i> spp.: epidemiologia, impactos e patogenicidade.....	14
2.2 Terapia e resistência antifúngica.....	18
2.3 Busca por novos antifúngicos: 2-cloro- <i>N</i> -fenilacetamida.....	21
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.	24
3.2 Objetivos Específicos.	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Local do trabalho	25
4.2 Substâncias e meios de cultura.....	25
4.3 Microrganismos.	26
4.4 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	26
4.5 Determinação de Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	27
4.6 Efeito sobre a cinética de crescimento microbiano	27
4.7 Inibição de formação de biofilme	28
4.8 Ruptura de biofilme pré-formado	28
4.9 Ação do produto na parede celular fúngica	29
4.10 Ação do produto na membrana celular fúngica.	30
4.11 Estudo de associação – Método <i>checkerboard</i>	30
4.12 Análise de dados.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Antifungal activity of 2-chloro- <i>N</i> -phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant <i>Candida</i> spp	32
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE – CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA	53

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas são um problema atual e recorrente de saúde pública em todo o mundo, afetando de maneiras e graus diferentes variadas populações. Deste tipo de infecções, o gênero *Candida* é responsável por 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas (ALVAREZ-MORENO; CORTES; DENNING, 2018; GAMALETSSOU; WALSH; SIPSAS, 2018). A candidíase, causada por espécies deste fungo, pode se apresentar como infecções superficiais cutâneo-mucosas, mais frequentes, e como micoses sistêmicas, menos frequentes mas com maior potencial de morbimortalidade (LAMOTH et al., 2018).

Apesar de *Candida albicans* ser o agente patogênico predominante nestes casos, uma mudança epidemiológica em diversas regiões tem sido observada, com um número crescente de casos provocados por espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* entre outras. Entre tais espécies, destaca-se o complexo *C. parapsilosis*, como agente etiológico de candidíase invasiva em ascensão na África e América Latina, tendo como agravante a frequência de resistência antifúngica detectada em isolados clínicos (ASADZADEH et al., 2017; CANELA, H M S et al., 2017; DA SILVA RUIZ et al., 2013; JAIN; RAWAT; RAI, 2017; LAMOTH et al., 2018; MARINS et al., 2018; ZUPANČIČ; BABIČ; GUNDE-CIMERMAN, 2018).

Além da resistência antimicrobiana, fatores de patogenicidade como a formação de biofilme, o que dificulta o acesso da molécula ao alvo farmacológico, toxicidade e custo de tratamentos alternativos representam obstáculos relevantes para um manejo adequado com prognóstico positivo do paciente (VITALE, 2021).

Diante disto, vale ressaltar a urgência e importância da prospecção de novos fármacos na tentativa de contornar ou controlar as infecções provocadas por tais patógenos, buscando alternativas em produtos de origem natural ou obtidos sinteticamente.

A 2-cloro-*N*-fenilacetamida é uma molécula amplamente utilizada como reagente em síntese orgânica para se obter uma variada gama de substâncias, obtendo como produtos outras moléculas farmacologicamente ativas com efeito antimicrobiano (YADAV et al., 2018), analgésico e anti-inflamatório (GOUDA et al., 2018), além de pertencer a uma classe de moléculas conhecidamente herbicidas (MA et al., 2021).

Vale salientar que, apesar da ampla utilização e do potencial biológico apresentado pela classe química e derivados desta molécula, nenhuma investigação aprofundada sobre o potencial antifúngico desta substância foi realizada até o momento, o que enfatiza a relevância e ineditismo desta pesquisa na contribuição ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra estas infecções de elevada importância, buscando investigar seu potencial antimicrobiano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida* spp.: epidemiologia, impactos e patogenicidade

A incidência de infecções fúngicas aumentou substancialmente nas últimas duas décadas, estimando uma ocorrência de 300 milhões de casos com 1.6 milhões de mortes anualmente em todo o mundo, tendo como grupos de risco pacientes imunossuprimidos (transplantados e com outras condições como infecção por HIV) ou Sars-CoV-2 (ITO, 2022; SEAGLE et al., 2022).

No Brasil, estima-se que aproximadamente 3 milhões de casos graves de candidíase ocorram por ano, com taxas de mortalidade que podem chegar até 70% (DOI et al., 2016; GIACOMAZZI et al., 2016). Em estudo conduzido nos EUA, aproximadamente 60% dos casos de infecções fúngicas diagnosticados foram provocados pelo gênero *Candida* (RAYENS; NORRIS, 2022).

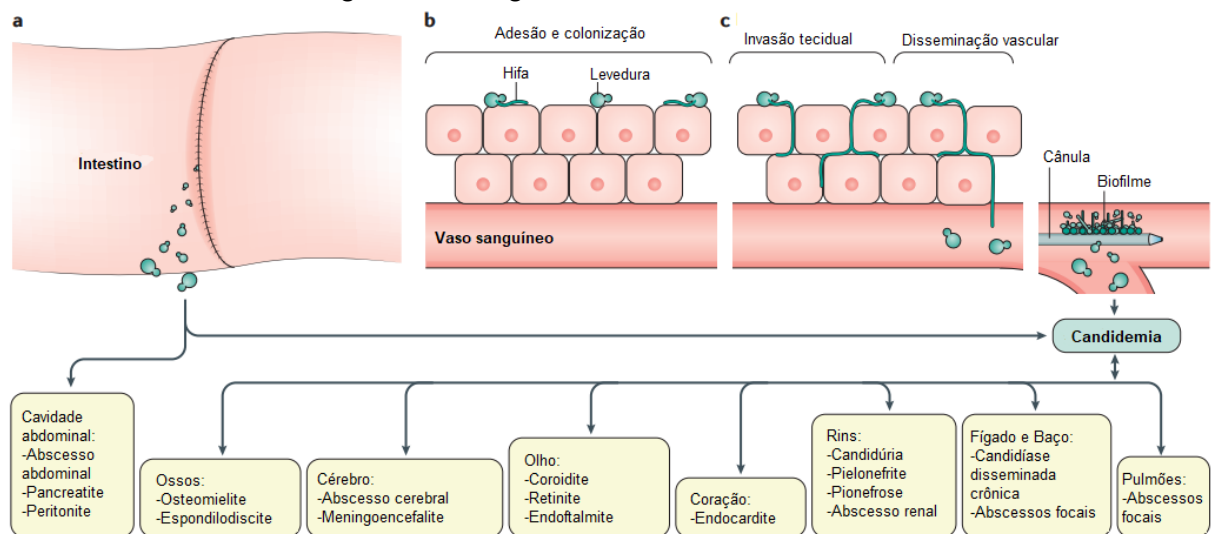
Tais infecções atualmente representam um desafio importante para os governos mundiais devido aos elevados custos associados para os próprios sistemas de saúde e para a própria economia do país, em que a soma dos custos diretos e indiretos (internações, tratamentos, perda de dias trabalhados, baixa qualidade de vida, entre outros) podem chegar a U\$ 48 bilhões anualmente em um país como os Estados Unidos da América (EUA) (BENEDICT; WHITHAM; JACKSON, 2022).

Um agente etiológico recorrente em boa parte destas infecções são leveduras do gênero *Candida*, um fungo ubíquo, incluindo a pele e mucosas humanas, onde apresenta caráter comensal e oportunista (JACOBSEN; HUBE, 2017).

Sob algumas circunstâncias que possam favorecer seu crescimento e sobrevivência, este fungo pode provocar infecções de variados níveis de gravidade, desde uma candidíase superficial até um quadro de micose sistêmica. Entre tais fatores de risco para a candidíase invasiva estão citados: procedimentos médicos invasivos (cateterismo venoso central, transfusão sanguínea, nutrição parenteral), uso de antibióticos de amplo espectro, comorbidades diversas (diabetes mellitus) e uso de drogas imunossupressoras (CORTÉS; CORRALES, 2018; DE CÁSSIA ORLANDI SARDI et al., 2021; THOMAS-RÜDDEL et al., 2021; TIGEN et al., 2017). Entretanto, já foi relatada na literatura a ocorrência de candidíase mesmo em pacientes imunocompetentes (RUDRAMURTHY; SINGH, 2020).

A candidemia, também chamada de candidíase invasiva, disseminada, profunda ou sistêmica, é a denominação atribuída à infecção sintomática de tecidos estéreis (coração, sistema nervoso central, pulmão e medula óssea) e corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida* e pode apresentar manifestações clínicas diferentes de acordo com o local acometido (endocardite, endoftalmite, osteomielite, meningoencefalite, pielonefrite e abscessos no fígado, rins ou pulmões) (Figura 1) (TALAPKO et al., 2021).

Figura 1 – Patogênese da candidíase invasiva.



Fonte: Adaptado de PAPPAS et al. (2018)

O diagnóstico rápido da candidíase invasiva é um fator decisivo para o sucesso do tratamento. Entretanto, este é um objetivo ainda difícil de ser atingido por dois motivos: os métodos tradicionais que se baseiam na detecção através de cultura hematológica, são pouco sensíveis e podem levar um tempo prolongado para obter resultados (CLANCY; NGUYEN, 2013; ROUZÉ; ESTELLA; TIMSIT, 2022); infecções fúngicas sistêmicas em geral também tendem a ser negligenciadas e subestimadas, tanto pelo corpo clínico quanto por órgãos de saúde e agências financiadoras de pesquisa (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2021).

Métodos moleculares para diagnóstico como a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*, PCR) e espectrometria de massa por ionização com dessorção à laser assistido por matriz e analisador de tempo de voo (*Matrix-assisted laser desorption-time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) para detecção de antígenos fúngicos como DNA e componentes da parede celular fúngica tem sido desenvolvidos com boa sensibilidade (cerca de 75%) e rápida obtenção de resultados

(minutos), mas sua aplicabilidade na rotina clínica ainda é limitada (KOC et al., 2022; MONDAY; PARRAGA ACOSTA; ALANGADEN, 2021).

Modelos preditivos do risco de candidíase invasiva também tem sido desenvolvidos na tentativa de decidir com maior rapidez pela intervenção terapêutica empírica, atestando a importância de tratamento rápido para o sucesso clínico, sobretudo em ambientes em que métodos automatizados não estejam disponíveis (RISANDY et al., 2021; YOO et al., 2021).

Apesar de *C. albicans* ser tradicionalmente a espécie mais isolada em casos de candidíase invasiva, recentemente, têm ocorrido um aumento dos casos de infecção hospitalar provocados por espécies não-*albicans* do gênero *Candida*, sendo algumas destas espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*, inclusive com notificação de surto de contaminação entre centros hospitalares por linhagem deste patógeno resistente a fluconazol durante o período mais crítico da pandemia do Sars-CoV-2 (ENOCH et al., 2017; HARE et al., 2022; JAIN; RAWAT; RAI, 2017; THOMAZ et al., 2022).

O complexo *C. parapsilosis* engloba as espécies *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (TAVANTI et al., 2005). O perfil de susceptibilidade antifúngica, prevalência e virulência pode variar entre estas espécies, cuja diferenciação é realizada através de métodos moleculares como MALDI-TOF MS (HAAS et al., 2016; MARCOS- ARIAS et al., 2020).

Este complexo também tem figurado como o segundo agente causador de candidemia mais frequente em alguns países do sul da Europa, África, América do Norte e em grande quantidade, na América do Sul, tendo como grupos de risco recém-nascidos, pacientes transplantados e portadores de outras condições como câncer. Vale notar que esta espécie tradicionalmente apresenta perfil de susceptibilidade diminuído a equinocandinas, sendo o uso de azólicos mais indicado. Porém, diminuição da susceptibilidade à azólicos como fluconazol também tem sido registrada para este complexo (DEMIRCI- DUARTE; ARIKAN- AKDAGLI; GÜLMEZ, 2021; MEDEIROS et al., 2019; SUN et al., 2019; TÓTH et al., 2019; ZUPANČIČ; BABIČ; GUNDE-CIMERMAN, 2018).

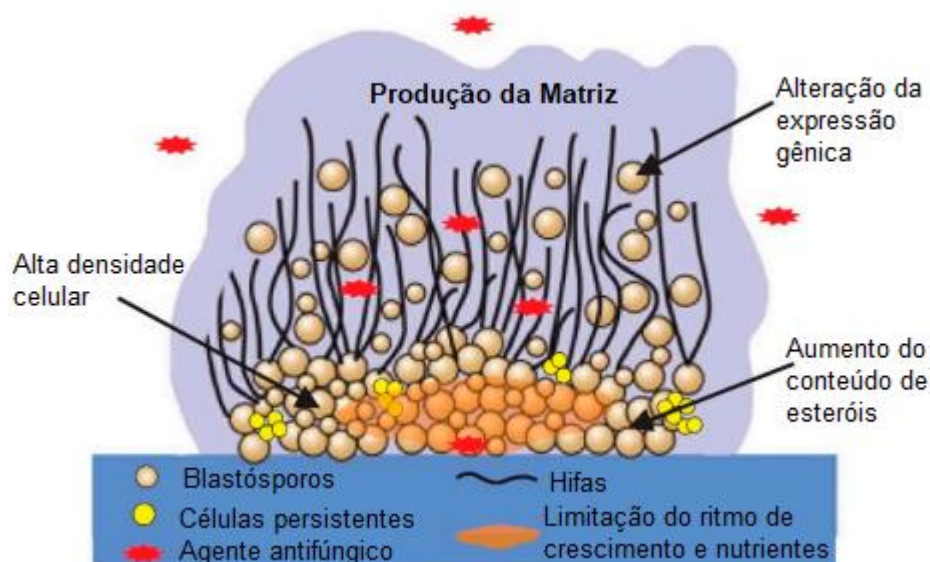
Alguns fatores de virulência favorecem a sobrevivência e disseminação ambiental assim como a invasão tecidual e permanência deste fungo no hospedeiro. Além da adaptação metabólica deste gênero, algumas espécies podem sofrer uma transição morfológica de levedura para formas filamentosas conhecidas como hifas

(também chamadas de pseudohifas de acordo com alguns autores), que contém alta capacidade de provocar dano e invasão tecidual, permitindo que este patógeno atinja mais facilmente tecidos e órgãos mais profundos (DUNKER et al., 2021; LOPES; LIONAKIS, 2022).

A formação de hifas também pode levar ao desenvolvimento de biofilme microbiano, uma estrutura de maior complexidade que confere ainda mais resistência ao patógeno por torna-lo mais apto à permanência em determinados ambientes (NETT; ANDES, 2020; SILVA et al., 2017).

O biofilme de *Candida* spp. (Figura 2) é formado por uma matriz extracelular composta por alta densidade celular de hifas, células metabolicamente inertes que exibem tolerância a diversos antifúngicos, chamadas de células persistentes e uma mistura de substâncias excretadas pelo fungo, como proteínas (55%), polissacarídeos semelhantes aos encontrados na parede celular fúngica (25%), lipídeos (15%), principalmente esteróis cuja produção é aumentada, e ácidos nucleicos (5%), que influenciam na expressão gênica das células sésseis (NETT, 2014; TALAPKO et al., 2021). Com esta organização, a matriz do biofilme provê um ambiente que favorece o fornecimento de nutrientes, água e sinalizadores químicos, assim como a proteção de fatores externos como fármacos e células imunológicas (XU et al., 2022).

Figura 2 – Mecanismos envolvidos na resistência do biofilme de *Candida* spp.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., (2017).

Por estes motivos, o biofilme fúngico formado em superfícies de materiais médico-hospitalares e também em tecidos do hospedeiro são um importante fator de virulência e patogenicidade de espécies deste gênero fúngico.

2.2 Terapia e resistência antifúngica

O tratamento da candidíase sistêmica se baseia no estado clínico do paciente e da espécie de *Candida* isolada, assim como o seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos disponíveis, os quais pertencem a três classes: azólicos (fluconazol, voriconazol e itraconazol), equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e poliênicos (de anfotericina B). O complexo lipídico de anfotericina B e o itraconazol são medicamentos antifúngicos disponíveis no estoque estratégico do Ministério da Saúde, dispensados pela área técnica de Vigilância e Controle das Micoses Sistêmicas, desde 2008 (BRASIL, 2021).

Além do uso tradicional de fluconazol para o manejo inicial de candidíase invasiva, diretrizes recentes como a brasileira e a americana, passam a recomendar a utilização de equinocandinas como tratamento inicial inespecífico para candidíase invasiva. Após identificação da espécie e teste de susceptibilidade antifúngica, terapias alternativas incluem fluconazol (quando este não foi utilizado como primeira escolha) e anfotericina B lipossomal. O esquema terapêutico deve ser mantido por 14 dias após as hemoculturas apresentarem resultado negativo (COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2016; WANG et al., 2019).

Em se tratando de terapia específica para a *Candida parapsilosis*, apenas fluconazol como terapia inicial e anfotericina B lipossomal, voriconazol, itraconazol e equinocandinas como terapia alternativa foram relatados por diretrizes de Taiwan, Irã, Japão e União Européia (WANG et al., 2019).

Apesar das recomendações do uso de equinocandinas como primeira escolha e do declínio do uso de fluconazol devido ao surgimento de cepas resistentes, alguns hospitais e serviços de saúde ainda utilizam fluconazol e até mesmo anfotericina B desoxicolato como intervenção primária por questões financeiras ou apenas desconhecimento por parte da equipe clínica, apesar da ocorrência de resistência e toxicidade associados a estes fármacos, respectivamente (GAMARRA; NUCCI; NOUÉR, 2022; MARINS et al., 2018; MONI et al., 2022; PINTO-MAGALHÃES et al., 2019).

Os antifúngicos azólicos como o fluconazol atuam inibindo a via metabólica da biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*, responsável pela conversão de lanosterol a ergosterol,

um esterol fundamental na estrutura da membrana celular fúngica. Este mecanismo resulta na formação de um esterol tóxico, 14-metilergosta-8,24(28)-dieno-3,6-diol, convergindo na alteração da fluidez da membrana e comprometimento do crescimento fúngico. Também foi proposto que o fluconazol induz a autofagia da célula fúngica, contribuindo para sua ação antifúngica (MUSIOL; KOWALCZYK, 2012; YANG et al., 2022).

A anfotericina B, da classe dos poliênicos se liga diretamente ao ergosterol presente na membrana celular formando poros, levando ao extravasamento do conteúdo interno como água e íons ocasionando a morte celular. Um mecanismo alternativo é de que a anfotericina extrai ergosterol da membrana, formando uma estrutura semelhante a uma esponja que prejudica a estabilidade membranar. Apesar de sua eficácia no tratamento de infecção sistêmica, a anfotericina B possui alto grau de toxicidade, sobretudo a renal, ocorrendo em 80% dos pacientes tratados com este fármaco (ANDERSON et al., 2014; CAROLUS et al., 2020; KAMIŃSKI, 2014).

As equinocandinas atuam em nível de parede celular fúngica inibindo a enzima β -glucana-sintase, codificada pelo gene *FKS1/2*, que produz a 1,3- β -D-glucana, um polímero de função estrutural fundamental. A ausência deste polímero acarreta em ruptura da parede celular resultando em atividade fungicida especialmente em cepas de *Candida*, incluindo aquelas resistentes a antifúngicos azólicos e poliênicos. Além de sua notável atividade fungicida, esta classe é bem tolerada na terapêutica, produzindo menos efeitos adversos que outros fármacos utilizados contra candidíase sistêmica como a anfotericina B. Vale notar que um efeito antagônico ocorre ao utilizar doses muito altas desta classe, o que é chamado de “*Eagle effect*”, em que o fungo consegue crescer mesmo em altas concentrações do fármaco, supostamente por adaptação e estímulo das vias da calcineurina e síntese de quitina para manter a integridade da parede celular (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015; SZYMAŃSKI et al., 2022).

Já é bem estabelecido que a terapia combinatória é uma estratégia valiosa no aproveitamento de fármacos para a obtenção de maior sucesso terapêutico com melhores resultados clínicos do paciente, incluindo em casos de infecções fúngicas.

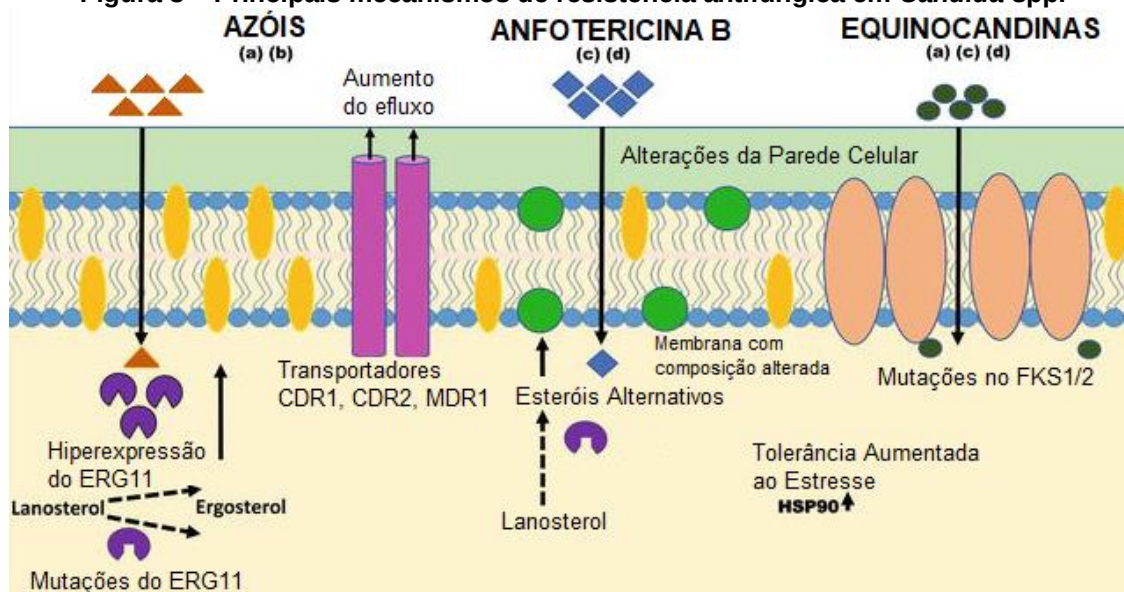
Estudos de associação entre antifúngicos diferentes permitem viabilizar uma terapia de êxito onde as monoterapias podem falhar, seja na erradicação do agente etiológico, seja no tratamento com poucos efeitos adversos indesejáveis para o paciente. Além disto, diante do aumento de casos provocados por linhagens

resistentes, o desenvolvimento de estratégias alternativas e/ou adjuvantes mais eficazes para as infecções sistêmicas torna-se crucial. Um exemplo disto é a combinação de anfotericina B com a flucitosina para o tratamento de candidíases mais graves com diminuição da chance do desenvolvimento de resistência, em comparação com a utilização da flucitosina isoladamente (THOMSON et al., 2017; VITALE, 2021).

Um grande obstáculo para o sucesso da terapia antifúngica certamente é o desenvolvimento de resistência antifúngica. Devido a plasticidade genética deste fungo, as espécies do gênero *Candida* podem facilmente adquirir resistência a um antifúngico. Além da adaptação, uma espécie pode apresentar resistência intrínseca, como ocorre com *C. krusei* e *C. parapsilosis* (DEMIRCI- DUARTE; ARIKAN-AKDAGLI; GÜLMEZ, 2021; KRONEN et al., 2017).

Espécies de *Candida* spp. podem apresentar diversos mecanismos de resistência antifúngica (Figura 3). Os mecanismos de resistência mais comuns apresentados são de modificações nos alvos farmacológicos, como mutações dos genes *ERG11* e *FKS1/2*, conferindo resistência a azólicos e equinocandinas, respectivamente (XISTO et al., 2017). Também pode ocorrer a hiperexpressão do gene *ERG11*, levando a um aumento das enzimas disponíveis, necessitando do aumento da dose de azólicos para atingir um efeito adequado (REVIE et al., 2018). A hiperexpressão de bombas de efluxo da superfamília de transportadores ligados a ATP (*ATP-binding cassette* - ABC) (*Candida drug resistance* - CDR1, CDR2) e da superfamília dos facilitadores majoritários (*Major facilitators superfamily* – MFS), (*Multidrug resistance* - MDR1) também impede que o fármaco chegue até o local de ação (RUIZ-BACA et al., 2021). Perda de função induzida por mutação nos genes *ERG3* e *ERG11* podem levar a formação de esteróis alternativos ao ergosterol, diminuindo a oferta deste alvo essencial para a ação da anfotericina B (BOHNER; PAPP; GÁCSEI, 2022). A resistência fúngica também depende da ação da proteína Hsp90, um importante regulador dos processos de adaptação, crescimento celular e resposta ambiental, induzindo o aparecimento de resistência através de alguns dos mecanismos já citados (CRUNDEN; DIEZMANN, 2021).

Figura 3 – Principais mecanismos de resistência antifúngica em *Candida* spp.



Legenda: (a) alteração do alvo enzimático; (b) hiperexpressão de bombas de efluxo; (c) diminuição de ergosterol na membrana celular; (d) aumento da tolerância a estresse e alteração da parede celular.

Fonte: Adaptado de RUIZ-BACA et al. (2021).

Além do difícil tratamento associado a significativas taxas de mortalidade (30 a 70% em alguns países), a candidemia também prolonga consideravelmente a estadia de pacientes em unidades de terapia intensiva, adicionando de 8 a 30 dias de permanência em ambiente hospitalar (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; RIERA et al., 2022).

Considerando que a ocorrência de resistência microbiana em cepas fúngicas vem acontecendo em ritmo mais acelerado que o descobrimento de moléculas antifúngicas, vale ressaltar a urgência e importância da prospecção de novos fármacos na tentativa de contornar ou controlar as infecções provocadas por tais patógenos, buscando alternativas em produtos de origem natural ou obtidos sinteticamente (FISHER et al., 2018).

2.3 Busca por novos antifúngicos: 2-cloro-*N*-fenilacetamida

Diante de um déficit perceptível no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, diversas estratégias são empregadas na tentativa de suplantarmos esta vulnerabilidade. Entre tais estratégias estão a prospecção de produtos naturais e derivados de origem vegetal e animal, que já demonstrou enorme potencial farmacológico em diversas áreas além da atenção contra infecções microbianas sobretudo em locais como Brasil, cuja biodiversidade e riqueza histórica-cultural

oferecem um amplo espaço de atuação para a etnofarmacologia (FERNANDES et al., 2019; FRANCO; VÁZQUEZ, 2020).

Além disto, a área de pesquisas *in silico* que utilizam modelos matemáticos através de *softwares* também surgem como um importante aliado na busca por novos agentes bioativos, possibilitando uma pesquisa direcionada mais rápida e econômica através de modelos preditivos de ação farmacológica (BRUNO et al., 2019).

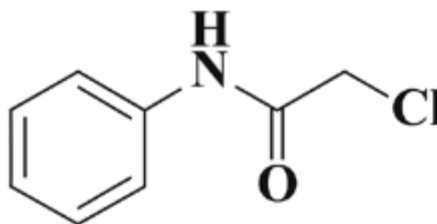
Especialmente nos anos recentes, sob o contexto de pandemia de Coronavírus (Sars-CoV-2), também temos visto o emprego extensivo de estratégias de reposicionamento de fármacos, ao avaliar substâncias já conhecidas e comercializadas para uma finalidade diferente daquela a qual foi desenvolvida, buscando reaproveitar dados e recursos para obter uma alternativa de forma mais rápida (BIBI et al., 2021).

Outra estratégia que já tem sido utilizada há vários anos e com um vasto registro de exemplos de sucesso é a obtenção de novos produtos e derivados otimizados através da síntese química (GALLARDO-GODOY et al., 2016; KIM et al., 2018).

Todas estas estratégias também podem ser empregadas em conjunto ao se analisar a relação estrutura-atividade de determinado grupos de moléculas em um modelo computacional, baseado em análises prévias de estudos etnofarmacológicos, comparação de produtos naturais conhecidamente bioativos ou reaproveitamento de fármacos já comercializados, para em seguida proceder a síntese química de análogos ou derivados na esperança de se obter um produto com qualidade farmacológica superior (DE ARAÚJO et al., 2013; SOUZA et al., 2019).

Como já exposto, o estudo de moléculas já conhecidas e utilizadas em determinadas finalidades sob uma nova ótica de utilização é uma maneira de se reaproveitar recursos e conhecimentos já obtidos ao se trabalhar com uma substância já familiar no ambiente científico. Isto pode ser aplicado e observado ao selecionar uma substância amplamente utilizada em diversas rotas sintéticas para obtenção de uma multitude de outros compostos, como o caso da 2-cloro-*N*-fenilacetamida (Figura 4), um reagente utilizado para obter derivados com ação antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (GOUDA et al., 2018; YADAV et al., 2018).

Figura 4 – Estrutura química da 2-cloro-*N*-fenilacetamida.



Fonte: Elaboração própria, 2022.

As cloroacetamidas, classe de moléculas a qual pertence a 2-cloro-*N*-fenilacetamida, já são comumente utilizadas como herbicidas mundialmente. Entretanto, apesar de sua toxicidade, derivados deste grupo de moléculas tem demonstrado notável atividade antifúngica (DA ROSA MONTE MACHADO et al., 2022; MA et al., 2021; MACHADO et al., 2019).

A escolha em particular da molécula 2-cloro-*N*-fenilacetamida provém da observação de estudos de triagem anteriores realizados por Aschale (2012), Katke et al. (2011) e Patel & Shaikh (2011) no qual observaram que a referida molécula apresentava atividade antimicrobiana, especialmente frente às amostras planctônicas de *C. albicans*. Entretanto, apenas uma cepa foi usada nos ensaios pelos autores. Esta molécula também já apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* (FERREIRA et al., 2021) e seus derivados foram eficazes contra *Klebsiella pneumoniae* (CORDEIRO et al., 2020).

Desta forma, buscou-se investigar de forma mais extensa o potencial antifúngico desta molécula ampliando a amostra microbiológica de *C. albicans* utilizando também outra espécie, *C. parapsilosis*, com perfil específico de resistência ao fluconazol, assim como aplicando outras metodologias para analisar o real potencial antifúngico da substância.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antifúngica de 2-cloro-*N*-fenilacetamida frente a linhagens de *C. albicans* e *C. parapsilosis* originadas de infecção hospitalar e cepas padrão.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar perfil de sensibilidade das cepas fúngicas frente antifúngicos padrões;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da 2-cloro-*N*-fenilacetamida;
- Avaliar o efeito da 2-cloro-*N*-fenilacetamida em associação aos antifúngicos contra as linhagens fúngicas testadas;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação da 2-cloro-*N*-fenilacetamida com ênfase nos seus efeitos sobre a parede celular e a membrana plasmática fúngica;
- Observar o efeito da substância sobre a cinética de crescimento microbiano das leveduras.
- Examinar o efeito da substância sobre a formação de biofilme assim como sobre biofilmes maduros.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba.

Os experimentos de análise do efeito sobre biofilme e sobre a integridade celular foram conduzidos utilizando o Laboratório Multiusuário do Departamento de Biologia Molecular (DBM) da UFPB.

4.2 Substâncias e meios de cultura

A 2-cloro-*N*-fenilacetamida foi fornecida pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e seus colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS), do Departamento de Química, CCEN, UFPB.

Os antifúngicos utilizados nos ensaios foram: fluconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B. Estas substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (Filial: São Paulo-SP). Todos os produtos utilizados foram pesados e devidamente solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de acordo com as concentrações desejadas (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003; PEREIRA et al., 2015).

Para a manutenção das cepas e linhagens e ensaios da atividade antifúngica, foram utilizados o Agar Sabouraud Dextrose – ASD, Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCO LABORATORIES/EUA/FRANÇA), e Roswell Park Memorial institute - RPMI 1640-L-glutamina (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), preparados segundo as descrições dos fabricantes.

4.3 Microrganismos

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas cepas padrão (ATCC – *American Type Culture Collection*) e linhagens de origem clínica oriundas de candidemia, sendo estas: *Candida albicans* ATCC-76485, *C. albicans* 117, *C. albicans* 516, *C. albicans* 587, *C. albicans* 616, *C. albicans* 699, *Candida parapsilosis* ATCC-22019, *C. parapsilosis* 439, *C. parapsilosis* 546, *C. parapsilosis* 689, *C. parapsilosis* 5770, *C. parapsilosis* 55117. Todas as linhagens fúngicas pertencem à coleção da Micoteca do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Para preparação do inóculo, as colônias dos micro-organismos foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, para obter um inóculo de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008; HADACEK; GREGER, 2000; OSTROSKY et al., 2008).

4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM dos produtos sobre as cepas de *Candida* foi realizada por meio da técnica de microdiluição em caldo em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de Caldo RPMI nos poços das placas. Em seguida, 100 µL do produto solubilizado, assim como os antifúngicos azólicos para determinação do perfil de resistência e anfotericina B como controle, foram dispensados nas cavidades da primeira coluna de cada placa. Logo depois, foi feita uma diluição seriada a uma razão de dois, de forma que as concentrações finais das substâncias nos poços após a adição do inóculo seja de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada linha da placa refere-se a uma cepa fúngica específica. As placas assepticamente fechadas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para ser realizada a leitura posteriormente. Paralelamente, foram realizados controle de esterilidade do meio e controle de viabilidade microbiana. Todo o ensaio foi realizado em triplicata. A CIM foi definida como a menor concentração dos produtos que produziram inibição, verificada como ausência de turbidez nos poços, quando em

comparação com seu controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios (ARENDROP et al., 2017; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008; ELOFF, 1998; HADACEK; GREGER, 2000).

4.5 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x4) nas placas de microdiluição foram adicionadas em 100 µL de caldo RPMI contidos em novas placas de cultura celular, onde foram incubadas por 24 h a 35±2°C. A CFM foi considerada como a menor concentração do produto em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios e a natureza da atividade foi considerada como sendo fungicida quando a razão $CFM/CIM \leq 4$ e fungistática quando $CFM/CIM > 4$ (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; SALIE; EAGLES; LENG, 1996; SIDDIQUI et al., 2013).

4.6 Efeito sobre a cinética de crescimento microbiano

Procedimentos para o presente ensaio foram realizados utilizando a metodologia de Klepser et al., (1998) com algumas modificações. Curvas de crescimento microbiano em função do tempo foram utilizadas para avaliar o efeito de inibição exercido pela substância em diferentes concentrações. Numa placa de microdiluição de 96 poços de fundo plano foi adicionado meio de cultura a cada poço seguido da 2-Cloro-n-fenilacetamida em concentrações correspondentes a CIMx4 (1024 µg/mL), CIMx2 (512 µg/mL) e CIM (256 µg/mL). Finalmente, 100 µL de inóculo fúngico foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C em leitor de microplacas (BIOTEK™ EON™) e os valores de absorbância foram lidos a 530 nm a cada quatro horas. O experimento foi realizado em triplicata. As curvas de crescimento foram construídas plotando a absorbância registrada pelo leitor de microplacas em função do tempo (horas) com o *software* estatístico

GraphPadPrism (versão 6.0 para Windows, San Diego, CA - USA) (KLEPSEK et al., 1998, 2000).

4.7 Inibição de formação de biofilme

A capacidade das espécies de *Candida* de formar biofilme é um fator agravante no controle desse patógeno, uma vez que facilita sua disseminação. Dessa forma, um produto capaz de impedir a instalação desta estrutura em várias superfícies torna-se um recurso valioso na prevenção dessas infecções fúngicas (LOHSE et al., 2020).

Para avaliar o efeito de 2-cloro-N-fenilacetamida na inibição da formação de biofilme, 10 µL de inóculo fúngico de *C. albicans* (ATCC-76485, 117, 516, 587 e 616) e *C. parapsilosis* (ATCC-22019, 439, 689 e 5770) foram incubados durante 48h a 35±2°C em 100µL de caldo RPMI com diferentes concentrações de 2-cloro-N-fenilacetamida (MICx4, MICx2, MIC, MIC/2, MIC/4). Em seguida, os poços foram esvaziados, lavados com água destilada estéril para a remoção de células não aderidas e separados para secagem à temperatura ambiente. Após a secagem, o conteúdo fixado nas paredes dos poços foi tingido com 140µL de solução de cristal violeta em 1% (NEWPROV®) por 40 minutos. Após o descarte e lavagem do excesso de corante e secagem, foram adicionadas 140µL de etanol absoluto (RIOQUÍMICA®) por 30 minutos.

A quantificação de células fixas e tingidas nas paredes do poço foi realizada em espectrofotômetro para microplaca (Multiskan GO) a 590 nm. Ao mesmo tempo, o controle negativo foi realizado apenas com o meio cultural e o inóculo fúngico. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média aritmética dos valores de absorção obtidos, sendo plotados em gráficos com o software estatístico GraphPadPrism (version 6.0 for Windows, San Diego, CA - USA). O percentual de inibição da formação de biofilme foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: % inibição de formação de biofilme = 100 - [(ABS₅₉₀ teste/ABS₅₉₀ controle) x 100] (BALASUBRAMANIAN et al., 2012; ONSARE; ARORA, 2015).

4.8 Ruptura de biofilme pré-formado

Além de prevenir a formação de biofilme, produto capaz de penetrar e danificar sua estrutura já formada também adquire grande relevância bioativa, uma

vez que um biofilme já estabelecido confere grande resistência ao fungo contra agressões externas como drogas antifúngicas (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

Para observar se o produto exibe esta propriedade, 10µL do inóculo fúngico de *C. albicans* (ATCC-76485, 117, 516, 587 e 616) e *C. parapsilosis* (ATCC-22019, 439, 689 e 5770) foram incubados por 48h a 35±2°C em 100µL de caldo RPMI. Após a eliminação do conteúdo dos poços, 100µL de RPMI contendo diferentes concentrações de 2-cloro-*N*-fenilacetamida (CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4) foram adicionados e incubados por mais 48h à 35±2°C.

Então, após coloração das células fixadas nos poços, como descrito anteriormente, a densidade óptica da solução cristal violeta-etanol foi medida em leitor de microplaca (Multiskan GO) a 590 nm. Paralelamente, foi realizado o controle negativo onde o meio de cultura, sem a substância de teste, foi adicionado aos poços com biofilme formado. Todas as análises foram realizadas em triplicado e os resultados foram expressos como a média aritmética dos valores de absorção obtidos, sendo plotados em gráficos com o software estatístico GraphPadPrism (version 6.0 for Windows, San Diego, CA - USA). O percentual de ruptura do biofilme foi calculado utilizando a seguinte fórmula: % de ruptura do biofilme = $100 - [(ABS_{590} \text{ teste} / ABS_{590} \text{ controle}) \times 100]$ (ONSARE; ARORA, 2015; RAJASEKHARAN et al., 2017).

4.9 Ação do produto na parede celular fúngica

Buscando observar se a 2-cloro-*N*-fenilacetamida causa danos a parede celular fúngica, a CIM do produto foi avaliada na presença e ausência de um estabilizador osmótico, o sorbitol. Caso um produto atue de alguma forma sobre a parede celular fúngica, ele provocará lise celular quando na ausência do sorbitol, mas permitirá o crescimento das leveduras na presença deste protetor osmótico.

A determinação da CIM do produto, na presença do sorbitol, foi realizada pelo método de microdiluição de forma semelhante ao item 3.5.1, onde os micro-organismos foram expostos em diferentes concentrações do produto-teste em um meio com sorbitol (0,8M). Paralelamente foram realizados controles com caspofungina, de esterilidade do meio e de viabilidade microbiana (FROST et al., 1995; ZACCHINO, 2001).

4.10 Ação do produto na membrana celular fúngica

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol da membrana fúngica, ocasionando danos à membrana celular fúngica. Visto que a presença de ergosterol exógeno no meio de cultura induz a diminuição da ligação dos antifúngicos ao ergosterol da membrana, é esperado que a CIM destes produtos aumentem, uma vez que precisará de uma concentração muito maior da molécula antifúngica para que possa interagir com seu alvo molecular (VALGUS, 2003).

A determinação da CIM dos produtos contra cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foi realizada por microdiluição de forma semelhante ao item 3.5.1 onde os micro-organismos foram expostos em diferentes concentrações dos produtos-testes em um meio com ergosterol (400µg/mL). Por último, foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, agente antifúngico com conhecida afinidade e ação sobre ergosterol de membrana (ESCALANTE et al., 2008).

4.11 Estudo de associação – Método *checkerboard*

O efeito de associação da 2-cloro-n-fenilacetamida com antifúngico padrão foi determinado a partir da técnica de microdiluição – *checkerboard* para derivação do ICIF (Índice da concentração inibitória fracionada). Foram utilizadas soluções das substâncias em concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIM's. Inicialmente, 100 µL de caldo RPMI foram adicionados nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (ALAMAR®). Em seguida, 50 µL de cada produto testado, em diversas concentrações ($CIM \div 8$, $CIM \div 4$, $CIM \div 2$, CIM, $CIM \times 2$, $CIM \times 4$ e $CIM \times 8$ de acordo com o resultado observado nos ensaios posteriores) foram adicionados no sentido vertical (anfotericina B ou fluconazol) e horizontal (2-cloro-n-fenilacetamida) da microplaca. Por fim, foi adicionado 20 µL da suspensão fúngica. O ensaio foi realizado em duplicata, sendo as microplacas incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. O ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) foi calculado através da soma do $CIF_A + CIF_B$ (CIF_A = Concentração Inibitória Fracionada da 2-cloro-n-fenilacetamida; CIF_B = Concentração Inibitória Fracionada da anfotericina B ou fluconazol). O CIF_A , por sua vez, é calculado através da relação CIM_A combinado/ CIM_A isolado, enquanto que o $CIF_B = CIM_B$ combinado/ CIM_B isolado. Este

índice é interpretado da seguinte forma: sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), antagonismo ($ICIF > 4,0$) e indiferença ($0,5 < ICIF \leq 4$) (ODDS, 2003; SHIN, 2003).

4.12 Análise de dados

Os dados obtidos dos ensaios foram analisados de acordo com cada metodologia utilizada, selecionando os testes mais adequados para cada análise. Todos os resultados obtidos foram expressos como a média dos valores obtidos nos ensaios em duplicata e triplicata. Para os dados do ensaio de cinética de crescimento microbiano, inibição de formação de biofilme e ruptura de biofilme pré-formado foram utilizados análise de variância (ANOVA) *two-way* com pós-teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp

<https://doi.org/10.1590/1519-6984.255080>

Artigo aceito em 19 de janeiro de 2022 na revista *Brazilian Journal of Biology* (ISSN 1678-4375). Qualis Farmácia (quadriênio 2013-2016): B3.

Original Article

Antifungal activity of 2-chloro-*N*-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp.

Atividade antifúngica de 2-cloro-*N*-fenilacetamida: uma nova molécula com atividade fungicida e anti-biofilme contra *Candida* spp. resistentes a fluconazol

H. Diniz-Neto^{a*}, S. L. Silva^a, L. V. Cordeiro^a, D. F. Silva^a, R. F. Oliveira^b, P. F. Athayde-Filho^b, A. A. Oliveira-Filho^c, F. Q. S. Guerra^a and E. O. Lima^a

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Pharmaceutical Sciences – DCF, João Pessoa, PB, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Chemistry – DQ, João Pessoa, PB, Brasil

^cUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Rural Health and Technology Center – CTSR, Patos, PB, Brasil

Abstract

In the current context of emerging drug-resistant fungal pathogens such as *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, discovery of new antifungal agents is an urgent matter. This research aimed to evaluate the antifungal potential of 2-chloro-*N*-phenylacetamide against fluconazole-resistant clinical strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The antifungal activity of 2-chloro-*N*-phenylacetamide was evaluated *in vitro* by the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), inhibition of biofilm formation and its rupture, sorbitol and ergosterol assays, and association between this molecule and common antifungal drugs, amphotericin B and fluconazole. The test product inhibited all strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, with a MIC ranging from 128 to 256 µg.mL⁻¹, and a MFC of 512-1,024 µg.mL⁻¹. It also inhibited up to 92% of biofilm formation and rupture of up to 87% of preformed biofilm. 2-chloro-*N*-phenylacetamide did not promote antifungal activity through binding to cellular membrane ergosterol nor it damages the fungal cell wall. Antagonism was observed when combining this substance with amphotericin B and fluconazole. The substance exhibited significant antifungal activity by inhibiting both planktonic cells and biofilm of fluconazole-resistant strains. Its combination with other antifungals should be avoided and its mechanism of action remains to be established.

Keywords: antifungal drug resistance, antifungal susceptibility, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, invasive candidiasis.

Resumo

No atual contexto de patógenos fúngicos resistentes emergentes tais como *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, a descoberta de novos agentes antifúngicos é uma questão urgente. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico da 2-cloro-*N*-fenilacetamida contra cepas clínicas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol. A atividade antifúngica da substância foi avaliada *in vitro* através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), ruptura e inibição da formação de biofilme, ensaios de sorbitol e ergosterol, e associação entre esta molécula e antifúngicos comuns, anfotericina B e fluconazol. O produto teste inibiu todas as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com uma CIM variando de 128 a 256 µg.mL⁻¹, e uma CFM de 512-1,024 µg.mL⁻¹. Também inibiu até 92% da formação de biofilme e causou a ruptura de até 87% de biofilme pré-formado. A 2-cloro-*N*-fenilacetamida não promoveu atividade antifúngica pela ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, tampouco danificou a parede celular. Antagonismo foi observado ao combinar esta substância com anfotericina B e fluconazol. A substância exibiu atividade antifúngica significativa ao inibir tanto as células planctônicas quanto o biofilme das cepas resistentes ao fluconazol. Sua combinação com outros antifúngicos deve ser evitada e seu mecanismo de ação deve ser estabelecido.

Palavras-chave: resistência antifúngica, susceptibilidade antifúngica, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, candidíase invasiva.

*e-mail: hermes.dn@hotmail.com

Received: August 5, 2021 – Accepted: January 19, 2022



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

Fungal infections are a serious global problem, accounting for more than 1.6 million deaths annually (Almeida et al., 2019). Infections caused by *Candida* spp. are the most frequent, accounting for 80% of cases of systemic fungal infections (Alvarez-Moreno et al., 2018; Gamaletsou et al., 2018). Candidiasis usually manifests as superficial cutaneous-mucosal infections, but can also progress to the disseminated form, candidemia (Lamoth et al., 2018).

Although *C. albicans* remains the most common fungal pathogen worldwide, a significant increase in infections caused by non-*albicans* species is reported in the last decade (Jain et al., 2017; Lamoth et al., 2018; Vieira et al., 2018). Of such species, *C. parapsilosis* has already been ranked as the second most frequent cause of candidemia in some countries of Southern Europe, Africa, North America and, notably, in a great portion of South America, especially in neonates, transplant recipients and patients with other malignancies such as cancer (Silva et al., 2012; Sun et al., 2019; Tóth et al., 2019; Zupančič et al., 2018).

Therapeutic failure in the treatment of certain fungal strains has been described in several clinical, epidemiological, pharmacological and case reports studies. This is due to the occurrence of antifungal resistance, which is a well-known threat and is continuously increasing worldwide (Aldarde et al., 2020; Asadzadeh et al., 2017; Fisher et al., 2018; Hassanmoghadam et al., 2019; Reinhardt et al., 2020).

The difficulty of treatment, length of stay and associated costs, toxicity and scarcity of antifungal drugs, mortality rates, and antifungal resistance aggravates the challenge in tackling these infections and brings the urge to develop new antifungals in order to overcome this threat (Chatelon et al., 2019; Kneale et al., 2016; Olachea et al., 2004).

An organic synthesis is a valuable tool in developing new pharmacologically active compounds. Thus, new and old substances are being studied to this goal, expanding the options of available products with antifungal potential.

The 2-chloro-*N*-phenylacetamide with a molecular formula of C_8H_8ClNO (Figure 1) is a molecule extensively used in organic synthesis to obtain a wide range of substances, producing other pharmacologically active molecules with antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic effect (Gouda et al., 2018; Yadav et al., 2018).

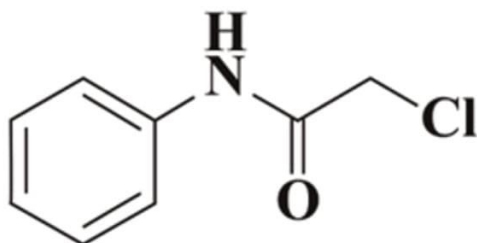


Figure 1. The chemical structure of 2-chloro-*N*-phenylacetamide.

Since the antifungal potential of this molecule was not fully investigated, the present study aims to thoroughly analyze its antifungal properties, as well as the resistance profile of the selected strains. Hence, the antifungal susceptibility of the strains was assessed through microdilution technique to determine the test product minimum inhibitory and minimum fungicidal concentrations, and later, studies of the microbial growth curve, biofilm inhibition and rupture potential, mechanism of action and association study with amphotericin B and fluconazole were conducted.

2. Materials and Methods

2.1. Test substance and antifungal drugs

The test substance 2-chloro-*N*-phenylacetamide was synthesized and provided by the Laboratory of Bioenergy and Organic Synthesis, of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil (Peixoto et al., 2016). The antifungals employed in the trials were: fluconazole, voriconazole, and amphotericin B. These substances were purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). The 2-chloro-*N*-phenylacetamide and the antifungal drugs were solubilized in 5% dimethyl-sulfoxide (DMSO) and 2% Tween 80, to obtain emulsions in the concentrations necessary for use in the tests (Cleeland and Squires, 1991; Hood et al., 2003; Pereira et al., 2015).

2.2. Culture media

The culture medium Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was used for the maintenance of the strains. The liquid culture medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-L-glutamine (without sodium bicarbonate) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil) was used for the antifungal assays. Both culture media were prepared according to the manufacturer's instructions.

2.3. Microorganisms

In the experiments, standard strains of *Candida albicans* ATCC 76485 (American Type Culture Collection) and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were used, as well as clinical strains of *C. albicans*: LM-117, LM-516, LM-587, LM-616, LM-699; and *C. parapsilosis* (sensu lato): LM-439, LM-546, LM-5770, LM-55117. The susceptibility profiles of these strains to amphotericin B, voriconazole and fluconazole, according to the CLSI criteria are presented in Table 1.

The fungal strains were provided by the Antibacterial and Antifungal Activity Research Laboratory of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil. The microorganisms were kept in SDA at 4 °C until the realization of the tests. Prior to each experiment, the cells were reactivated on SDA agar plates. For inoculum preparation, the colonies of microorganisms were suspended in 0.85% sterile NaCl solution and adjusted to the 0.5 scale of McFarland standard (Cleeland and Squires, 1991; CLSI, 2008; Hadacek and Greger, 2000).

Table 1. Susceptibility profile of the tested strains.

Strains		AmB	Vrc	Flc
		MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
<i>C. albicans</i>	ATCC 76485	0.25 (S)	0.125 (S)	32 (R)
	LM-117	0.25 (S)	0.062 (S)	08 (R)
	LM-516	0.25 (S)	0.125 (S)	64 (R)
	LM-587	0.25 (S)	0.125 (S)	16 (R)
	LM-616	0.25 (S)	0.062 (S)	04 (I)
	LM-699	0.25 (S)	0.062 (S)	08 (R)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	0.25 (S)	0.125 (S)	16 (R)
	LM-439	0.50 (S)	0.50 (I)	32 (R)
	LM-546	0.50 (S)	0.50 (I)	16 (R)
	LM-689	0.25 (S)	0.50 (I)	64 (R)
	LM-5770	0.50 (S)	0.25 (I)	32 (R)
	LM-55117	0.25 (S)	0.25 (I)	08 (R)

Legend: AmB = Amphotericin B; Vrc = Voriconazole; Flc = Fluconazole; S = Susceptible; I = Intermediate; R = Resistant (CLSI, 2017, p. 60).

2.4. Minimum inhibitory concentration

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 2-chloro-phenylacetamide at the starting concentration of $1,024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ against the strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis* was determined through the broth microdilution technique in a 96-well microplate for cellular culture (Eloff, 1998; Hadacek and Greger, 2000; CLSI, 2008). At the same time, the medium sterility control (wells containing only the culture medium), microbial viability control (wells containing the culture medium with the fungal inoculum) and interference of the solubilizing agents (5% DMSO and 2% Tween 80), as well as a control with amphotericin B (at a starting concentration of $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were performed. The plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h for reading. The experiment was conducted in triplicate. The MIC was defined as the lowest concentration of the products in which there was visible inhibition of fungal growth in the wells when compared to its controls. The results were expressed as the arithmetic mean of the MIC's obtained in the three experiments.

2.5. Minimum fungicide concentration

After reading the MIC, $10 \mu\text{L}$ aliquots of the supernatant of the wells where complete inhibition of fungal growth was observed (MIC, MICx2 and MICx4) in the microdilution plates were transferred to the wells of a new microplate containing $100 \mu\text{L}$ of RPMI broth, where they were incubated by 24 h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. The experiment was conducted in triplicate. The MFC was considered as the lowest concentration of the product in which there was no fungal growth in the culture medium. The results were expressed as the arithmetic mean of the MFC's obtained in the three experiments (Ncube et al., 2008; Salie et al., 1996; Silva et al., 2020).

2.6. Microbial growth curve

For the following tests, one ATCC strain and one clinical strain of each species which showed high MIC results were randomly selected and used. The MIC assay results were confirmed by verifying the interference of different product concentrations (MIC, MICx2 and MICx4) on the microbial growth curve in a 24h period. Following the same procedure in the MIC assay, the plates were incubated for 24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in a microplate reader (BIOTEK™ EON™) and absorbance values were read at 530 nm every four hours. The experiment was carried out in triplicate. The growth curves were constructed by plotting the absorbance recorded by the microplate reader as a function of time (hours) with the statistical software GraphPad Prism (version 6.0 to Windows, San Diego, CA - USA) (Schacht et al., 2013; Stevenson et al., 2016).

2.7. Inhibition of biofilm formation

The ability of *Candida* species to form biofilm is an aggravating factor in the control of this pathogen, since it facilitates its dissemination. In this way, a product that is able to prevent the installation of this structure on various surfaces becomes a valuable resource in the prevention of these fungal infections (Lohse et al., 2020).

To assess the effect of 2-chloro-*N*-phenylacetamide in the inhibition of biofilm formation, $10 \mu\text{L}$ of fungal inoculum of *C. albicans* (ATCC-76485, 117, 516, 587 and 616) and *C. parapsilosis* (ATCC-22019, 439, 689 and 5770) were incubated by 48h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in $100 \mu\text{L}$ of RPMI broth at different concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide (MICx4, MICx2, MIC, MIC/2, MIC/4). Then, the wells were emptied, washed with sterile distilled water for the removal of unadhered cells and separated for drying at room temperature. After drying, the contents fixed on the walls of the wells was dyed with $140 \mu\text{L}$ of violet crystal

solution at 1% (NEWPROV®) for 40 minutes. After disposal and washing of excess dye and drying, 140 µL of absolute ethanol was added (RIOQUÍMICA®) for 30 minutes.

The quantification of cells fixed and dyed in the well walls was performed in microplate spectrophotometer (Multiskan GO) at 590 nm. At the same time, negative control was performed with only the culture medium and fungal inoculum. All analyses were performed in triplicate and the results were expressed as the arithmetic mean of the absorption values obtained, being plotted in graphs with the statistical software GraphPadPrism (version 6.0 for Windows, San Diego, CA - USA). The percentage of inhibition of biofilm formation was calculated using the following formula: % inhibition of biofilm formation = $100 - [(ABS_{590} \text{ test} / ABS_{590} \text{ control}) \times 100]$.

2.8. Rupture of preformed biofilm

In addition to preventing the formation of biofilm, a product that is capable of penetrating and damaging its already formed structure also acquires great bioactive relevance, since an already established biofilm confers great resistance to the fungus against external aggressions such as antifungal drugs (Tsui et al., 2016).

To observe if the product is capable of damaging the mature biofilm, 10 µL of fungal inoculum of *C. albicans* (ATCC-76485, 117, 516, 587 and 616) and *C. parapsilosis* (ATCC-22019, 439, 689 and 5770) were incubated for 48h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in 100 µL of RPMI broth for the biofilm formation. After disposal of the contents of the wells, 100 µL of RPMI broth containing different concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide (MICx4, MICx2, MIC, MIC/2, MIC/4) were added and incubated again for 48h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Then, similarly as described previously in the inhibition of biofilm formation, the steps for dyeing the fixed cells and reading in microplate spectrophotometer (Multiskan GO) at 590 nm were conducted. In parallel, the negative control was performed where the culture medium, without the test substance, was added to the wells with formed biofilm. All analyses were performed in triplicate and the results were expressed as the arithmetic mean of the absorption values obtained, being plotted in graphs with the statistical software GraphPadPrism (version 6.0 for Windows, San Diego, CA - USA). The percentage of biofilm rupture was calculated using the following formula: % of biofilm rupture = $100 - [(ABS_{590} \text{ test} / ABS_{590} \text{ control}) \times 100]$ (Rajasekharan et al., 2017).

2.9. Effect on fungal cell wall

In order to observe whether 2-chloro-*N*-phenylacetamide causes damage to the fungal cell wall, the MIC of the product was evaluated in the presence and absence of an osmotic stabilizer, sorbitol. If a product somehow affects the fungal cell wall, it will damage the cell when in the absence of sorbitol, on the other hand, yeast growth will occur in the presence of this osmotic protector.

The determination of the product's MIC in the presence of sorbitol was performed by the microdilution method, as described previously, where microorganisms were exposed to different concentrations of the test product in a medium containing sorbitol (0.8M). In parallel, controls

were carried out with caspofungin as well as to assure sterility of the medium and microbial viability (Frost et al., 1995; Zacchino, 2001).

2.10. Ergosterol binding assay

Still considered a gold standard in the treatment of invasive candidiasis, amphotericin B exerts its effects by interacting directly with the ergosterol found in the cellular membrane, damaging the fungal cell. Since the presence of exogenous ergosterol in the culture medium decreases the binding of antifungals to the membrane ergosterol, the MIC of substances such as amphotericin B and other products that act through this mechanism is expected to increase, since a higher concentration of the antifungal agent will be required to interact with its molecular target (Valgus, 2003).

The determination of the product's MIC against *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains was performed by the microdilution method, as described previously, where microorganisms were exposed to different concentrations of the test products in a medium with ergosterol (400 µg.mL⁻¹). Finally, the same procedure was performed with amphotericin B as control, an antifungal agent with known affinity and action on membrane ergosterol, as well as the controls of sterility and microbial viability (Escalante et al., 2008).

2.11. Association study – checkboard method

To assess the effects of the association between the 2-chloro-*N*-phenylacetamide and two standard antifungal drugs: fluconazole and amphotericin B; against the *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains, the checkerboard method was employed. Initially, 100 µL of the culture medium was added to the wells of a sterile 96-wells microplate with a "U" shaped bottom. At the same time, dilutions of the test products: 2-chloro-*N*-phenylacetamide, fluconazole and amphotericin B were prepared in tubes yielding concentrations higher and lower than its MICs (MICx8, MICx4, MICx2, MIC, MIC÷2, MIC÷4 and MIC÷8). Then, 50 µL of 2-chloro-*N*-phenylacetamide in the various concentrations was added to 50 µL of amphotericin B or fluconazole in each concentration in different microplates. In order to obtain different combinations between the concentrations, the substances were added in different directions in the microplate (acetamide added horizontally, and amphotericin B or fluconazole added vertically). Finally, 20 µL of the fungal suspension was added in all the wells. The assay was performed in triplicate, and the microplates were incubated for 24-48h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated using the following equation: $FICI = FIC_A + FIC_B$ (FIC_A = Fractional inhibitory concentration of 2-chloro-*N*-phenylacetamide; FIC_B = Fractional inhibitory concentration of amphotericin B or fluconazole). The FIC_A is calculated by the combined MIC_A/isolated MIC_A ratio, while the FIC_B is calculated by the combined MIC_B/isolated MIC_B ratio. The index is interpreted as follows: synergism ($FICI \leq 0.5$), indifference ($0.5 < FICI \leq 4$) and antagonism ($FICI > 4.0$) (Odds, 2003; Shin, 2003; Silva et al., 2020).

2.12. Statistical analysis

The data were analyzed by the Two-way Analysis of Variance (ANOVA) with the Bonferroni post hoc test, using the GraphPadPrism software (version 6.0 for Windows, San Diego, CA, USA). The data were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration assays

The 2-chloro-*N*-phenylacetamide antifungal profile was evaluated through MIC and MFC determinations. The results are presented in Table 2. The molecule presented inhibitory activity against all tested strains, with an MIC ranging from 128 to 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Against the *C. albicans* strains, the substance exhibited an MIC of 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 2 ($\approx 33\%$) strains and 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the other 4 ($\approx 67\%$) strains. For *C. parapsilosis*, the product exhibited an MIC of 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 3 (50%) strains, and 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the other 3 strains.

The molecule presented an MFC ranging between 512 and 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the tested yeasts. Against *C. albicans* strains, the substance exhibited an MFC of 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 2 (33%) strains, and 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for another 3 (50%) strains. For *C. parapsilosis* strains, the product exhibited an MFC of 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 3 (50%) strains.

In relation to the microdilution assay control groups, no fungal growth was observed in the control test containing only culture medium. Abundant fungal growth however was observed in the control test containing only culture medium and fungal inoculum, attesting to the viability of the strains. The same was observed with the solvent

(5% DMSO and 2% Tween 80) controls, indicating that the products did not interfere with the results.

The MFC:MIC ratio and the classification in which a substance can be considered fungicidal if its MFC:MIC ≤ 4 , or fungistatic if its MFC:MIC > 4 indicated that 2-chloro-*N*-phenylacetamide (for 8 (67%) of the strains tested) presents fungicidal activity (MFC:MIC ≤ 4) (Siddiqui et al., 2013).

3.2. Microbial growth curves

Being exposed to differing concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide, the yeast growth curves were also observed at different time intervals. The results are shown in the Figures 2 and 3.

The microbial growth curves shown in the figures above reveal that 2-chloro-*N*-phenylacetamide presents inhibitory activity against strains of *C. albicans*, after 4 hours of exposure with an effect directly proportional to its concentration. For *C. parapsilosis*, no statistical difference was observed for inhibitory effects at the different concentrations tested. Thus, for this species, the test product did not reveal concentration proportional activity.

3.3. Effect on fungal biofilms

The biofilm formation assay results are presented in Figures 4 and 5. Rupture percentages for already formed biofilm are presented in Figures 6 and 7.

According to the data obtained, we observed that 2-chloro-*N*-phenylacetamide inhibits biofilm formation (for both of the fungal species tested) in a concentration-dependent manner, being also able to inhibit 50% of biofilm formation when at sub-inhibitory concentrations (MIC/4).

Although there were no significant differences between species for inhibition rates at normal and supra-inhibitory concentrations (MIC, MICx2 and MICx4); at sub-inhibitory concentrations, *C. parapsilosis* strains continued to form

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of 2-chloro-*N*-phenylacetamide against strains of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.

Strains	2-chloro- <i>N</i> -phenylacetamide			SC	VC	S
	MIC	MFC	MFC/MIC			
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	128	$\geq 2,048$	ND (Fungistatic)	-	+	+
<i>C. albicans</i> LM-117	256	1,024	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. albicans</i> LM-516	256	1,024	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. albicans</i> LM-587	256	1,024	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. albicans</i> LM-616	256	512	2 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. albicans</i> LM-699	128	512	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	128	$\geq 2,048$	ND (Fungistatic)	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-439	256	1,024	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-546	256	1,024	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-689	256	1,024	4 (Fungicide)	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-5770	128	$\geq 2,048$	ND (Fungistatic)	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-55117	128	$\geq 2,048$	ND (Fungistatic)	-	+	+

Legend: ND = Not determined; SC = sterility control; VC = viability control; S = Solvent's control; - = Absence of microbial growth; + = Presence of microbial growth.

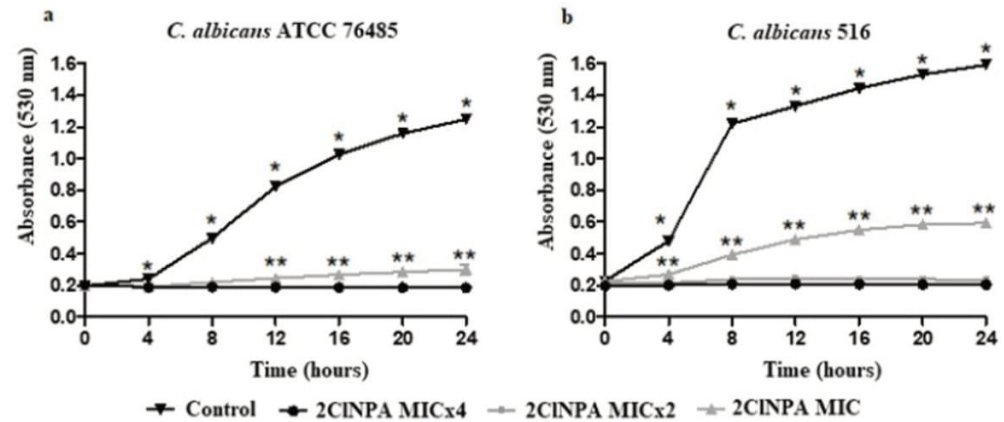


Figure 2. (a) microbial growth curve of *C. albicans* ATCC 76485 during a 24 h period; (b) microbial growth curve of *C. albicans* LM-516, during a 24 h period; 2CINPA, 2-chloro-*N*-phenylacetamide. *Statistical difference between the concentration and control groups ($P < 0.05$); **Statistical difference between the concentration groups ($P < 0.05$).

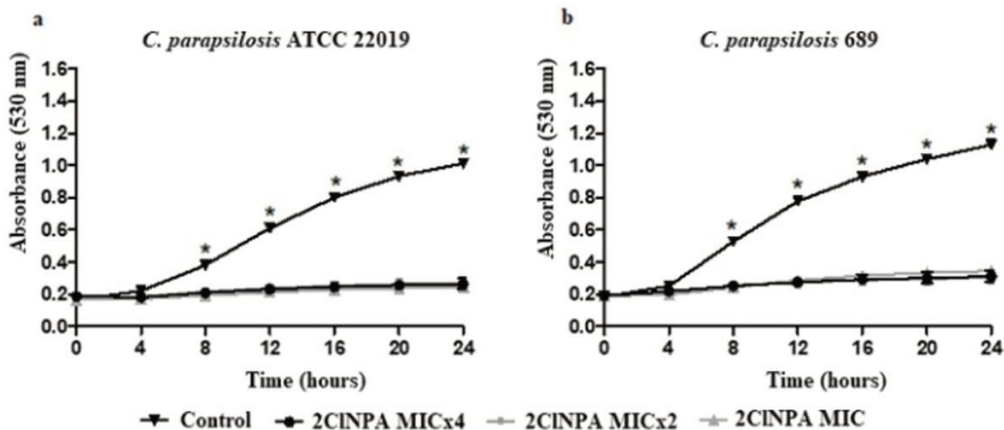


Figure 3. (a) Microbial growth curve of *C. parapsilosis* ATCC 22019 during a 24 h period; (b) Microbial growth curve of *C. parapsilosis* LM-689, during a 24 h period; 2CINPA, 2-chloro-*N*-phenylacetamide. *Statistical difference between the concentration and control groups ($P < 0.05$).

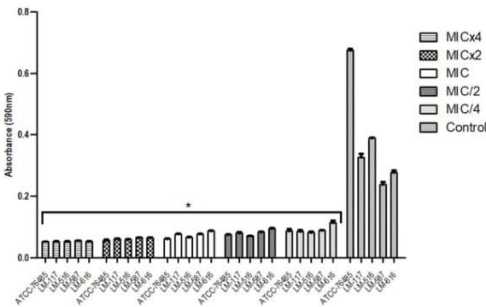


Figure 4. Biofilm formation of *C. albicans* strains exposed to different concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide. * $P < 0.05$ compared to the control group.

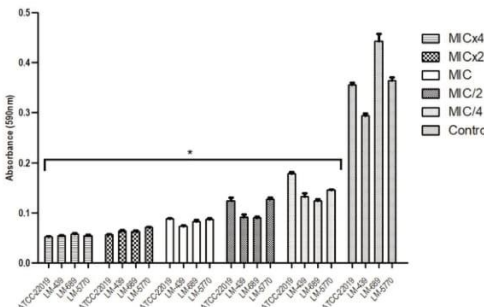


Figure 5. Biofilm formation of *C. parapsilosis* strains exposed to different concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide. * $P < 0.05$ compared to the control group.

greater amounts of biofilm; with respective differences of approximately 6% and 13% for MIC/2 and MIC/4). However, even at the lowest concentrations tested, 2-chloro-*N*-phenylacetamide was able to inhibit biofilm formation by 50% as compared to the control group. At higher concentrations, the substance inhibited biofilm formation by 76% to 92%.

Significant rates of (already formed) biofilm rupture for all strains in all of the tested 2-chloro-*N*-phenylacetamide concentrations, were demonstrated (with the exception of *C. albicans* strain 587; being below <50%, and only in sub-inhibitory concentrations) (Figure 6). The highest rupture rates (between 67% and 87%) were observed for

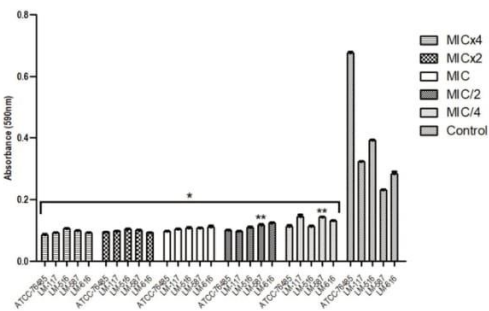


Figure 6. Rupture of *C. albicans* mature biofilm after exposure to different concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide. **P*<0.05 compared to the control group. **Rupture less than 50% compared to control.

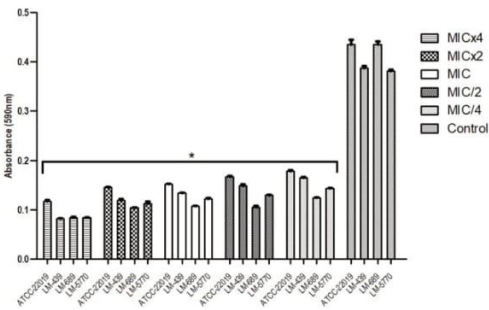


Figure 7. Rupture of *C. parapsilosis* mature biofilm after exposure to different concentrations of 2-chloro-*N*-phenylacetamide. **P*<0.05 compared to the control group.

the highest substance concentrations, and there were no significant differences between already formed biofilm rupture rates (between species) when tested at the same concentrations.

3.4. Investigation of mechanism of action through sorbitol and ergosterol assays

The effects on the fungal cell wall (sorbitol assay) and for binding to membrane ergosterol (ergosterol assay) were investigated as possible mechanisms of action. The results are presented in Tables 3 and 4.

The MIC of 2-chloro-*N*-phenylacetamide remained unchanged both in the absence and in the presence of ergosterol, unlike amphotericin B, whose MIC increased 32 times when exposed to exogenous ergosterol. The same occurred in the sorbitol assay, where the MIC of 2-chloro-*N*-phenylacetamide was unchanged both in the absence and in the presence of sorbitol and only the control with caspofungin presented an MIC increase.

3.5. Association study

The results of the 2-chloro-*N*-phenylacetamide association assay with amphotericin B and subsequently with fluconazole are shown in Table 5.

Antagonism (FICI ≥ 4) was observed for all strains tested in both of the 2-chloro-*N*-phenylacetamide antifungal associations. The inhibitory concentrations of the combined compounds were significantly higher than the inhibitory concentrations of the isolated products.

4. Discussion

The choice of 2-chloro-*N*-phenylacetamide resulted from observation of previous screening studies carried out by Aschale (2012); Katke et al. (2011); and Patel and Shaikh (2011), in which they observed antimicrobial activity, especially against planktonic strains of *C. albicans*. Yet their results needed further elucidation, since only one strain was used. Thus, in the present study, the number of planktonic strains (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) used was increased, with specific fluconazole resistance profiles, observing the molecule's activities against the biofilms produced by these species for the first time.

The MIC and MFC results together with the microbial growth curves reveal that 2-chloro-*N*-phenylacetamide presents inhibitory activity against strains of *C. albicans*,

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of 2-chloro-*N*-phenylacetamide and Amphotericin B against *C. albicans* and *C. parapsilosis* in the absence and presence of ergosterol 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Strains	2-chloro- <i>N</i> -phenylacetamide		Amphotericin B	
	-Ergosterol	+Ergosterol	-Ergosterol	+Ergosterol
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	128	128	0.25	8
<i>C. albicans</i> LM-516	256	256	0.25	8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	128	128	0.25	8
<i>C. parapsilosis</i> LM-689	256	256	0.25	8

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of 2-chloro-*N*-phenylacetamide and caspofungin against *C. albicans* and *C. parapsilosis* in the absence and presence of Sorbitol 0.8M.

Strains	2-chloro- <i>N</i> -phenylacetamide		Caspofungin	
	-Sorbitol	+Sorbitol	-Sorbitol	+Sorbitol
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	128	128	0.5	4
<i>C. albicans</i> LM-516	256	256	8	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	128	128	0.062	0.25
<i>C. parapsilosis</i> LM-689	256	256	0.062	0.25

Table 5. Determination of Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of the association between 2-chloro-*N*-phenylacetamide with amphotericin B and fluconazole on strains of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.

Strains	FIC _A	FIC _B	FICI (+Flc)	FIC _A	FIC _B	FICI (+AmB)
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	2	2	4 (A)	2	2	4 (A)
<i>C. albicans</i> LM-516	2	2	4 (A)	2	2	4 (A)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4	2	6 (A)	2	2	4 (A)
<i>C. parapsilosis</i> LM-689	2	2	4 (A)	2	2	4 (A)

Legend: Flc = Fluconazole; AmB = Amphotericin B; A = Antagonism.

after 4 hours of exposure with an effect directly proportional to its concentration. For *C. parapsilosis*, no statistical difference was observed for inhibitory effects at the different concentrations tested. Thus, for this species, the test product did not reveal concentration proportional activity.

Fungal cell adhesion and subsequent production of extracellular matrix is a major obstacle to the treatment of fungal infections. The protection provided to the fungal colony by mature biofilms makes treatment strategies that were previously effective obsolete, and new strategies which include higher concentrations (of active principle), and new drug associations are needed. For these reasons, substances such as 2-chloro-*N*-phenylacetamide, which are able to not only prevent biofilms from installing, but also capable of damaging the structure of an already formed biofilm, are promising agents for fungal infection control (Lohse et al., 2020; Nett, 2014; Nett and Andes, 2020; Tsui et al., 2016).

This is the first time that the anti-biofilm potential of 2-chloro-*N*-phenylacetamide has been explored against clinically relevant *Candida* species, further increasing the antifungal value of the molecule. Together with the other data of this work in its entirety, further study and research to investigate the full pharmacological potential of this substance and its possible derivatives is warranted.

The data from the present study indicate that 2-chloro-*N*-phenylacetamide does not act through binding to membrane ergosterol, nor does it damage the fungal cell wall. These findings are relevant because they show that the substance does not act on these two traditional pharmacological targets, and complementary studies must be carried out to investigate its mechanism of action and

to elucidate the way in which this substance exerts its antifungal effect.

The findings in the present study suggest that the addition of 2-chloro-*N*-phenylacetamide to antifungal agents such as azoles and polyenes should be avoided, since the performance of both molecules will be impaired, which may aggravate the fungal infection.

Antagonism between two drugs can compromise anti-infection therapy's success, since a decrease in the effective concentration of available bioactive molecules will compromise the desired effect against the pathogen. It is worth mentioning that any decision to combine two or more drugs must be supported by at least *in vitro* tests demonstrating the results of the association on the pathogen in question (Stein et al., 2016).

5. Conclusions

At the tested concentrations, 2-chloro-*N*-phenylacetamide presented both antifungal activity against strains of fluconazole resistant *C. albicans* and *C. parapsilosis*, and disruption and inhibition of fungal biofilm formation. The substance did not exert antifungal activity through two traditionally analyzed pathways, whether binding to ergosterol at the cell membrane or damaging the fungal cell wall. The test product demonstrated antagonism when in association with amphotericin B and fluconazole, an undesirable characteristic which restricts its use as a possible therapeutic adjuvant against fungal infections. Research regarding the exact mechanism of antifungal action is still required to fully understand this molecule potential.

Acknowledgements

This project was financed by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), concession number: 88882.347055/2019-01; and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), concession number: 302519/2012-2. The authors wish to thank for the support provided by the Federal University of Paraíba (UFPB) and the Brazilian funding agencies: CAPES, CNPq.

References

- ALDARDEER, N.F., ALBAR, H., AL-ATTAS, M., ELDALI, A., QUTUB, M., HASSANIEN, A. and ALRADDADI, B., 2020. Antifungal resistance in patients with Candidaemia: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, vol. 20, no. 1, pp. 55. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-4710-z>. PMID:31952505.
- ALMEIDA, F., RODRIGUES, M.L. and COELHO, C., 2019. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, pp. 214. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>. PMID:30809213.
- ALVAREZ-MORENO, C.A., CORTES, J.A. and DENNING, D.W., 2018. Burden of fungal infections in Colombia. *Journal of Fungi*, vol. 4, no. 2, pp. 41. <http://dx.doi.org/10.3390/jof4020041>. PMID:29561795.
- ASADZADEH, M., AHMAD, S., AL-SWEIH, N. and KHAN, Z., 2017. Epidemiology and molecular basis of resistance to fluconazole among clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. *Microbial Drug Resistance*, vol. 23, no. 8, pp. 966-972. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0336>. PMID:28353392.
- ASCHALE, M., 2012. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. *International Journal of Chemtech Research*, vol. 4, pp. 1437-1441.
- CHATELON, J., CORTEGIANI, A., HAMMAD, E., CASSIR, N. and LEONE, M., 2019. Choosing the right antifungal agent in ICU patients. *Advances in Therapy*, vol. 36, no. 12, pp. 3308. <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-019-01115-0>. PMID:31617055.
- CLEELAND, R. and SQUIRES, E., 1991. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, vol. 3, pp. 739-787.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI, 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard*. Wayne. CLSI document, no. M27-A3, Suppl. S (3).
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI, 2017. *Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts*. Wayne. CLSI supplement, no. M60.
- ELOFF, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, vol. 64, no. 8, pp. 711-713. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957563>. PMID:9933989.
- ESCALANTE, A., GATTUSO, M., PÉREZ, P. and ZACCHINO, S., 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*, vol. 71, no. 10, pp. 1720-1725. <http://dx.doi.org/10.1021/np070660i>. PMID:18816139.
- FISHER, M.C., HAWKINS, N.J., SANGLARD, D. and GURR, S.J., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, vol. 360, no. 6390, pp. 739-742. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aap7999>. PMID:29773744.
- FROST, D.J., BRANDT, K.D., CUGIER, D. and GOLDMAN, R., 1995. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of Antibiotics*, vol. 48, no. 4, pp. 306-310. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.48.306>. PMID:7775267.
- GAMALETSOU, M.N., WALSH, T.J. and SIPSAS, N.V., 2018. Invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: emergence of resistant pathogens and new antifungal therapies. *Turkish Journal of Haematology : Official Journal of Turkish Society of Haematology*, vol. 35, no. 1, pp. 1-11. <http://dx.doi.org/10.4274/tjh.2018.0007>. PMID:29391334.
- GOUDA, A.M., ABDELAZEEM, A.H., ABDALLA, A.N. and AHMED, M., 2018. Pyrrolizine-5-carboxamides: exploring the impact of various substituents on the anti-inflammatory and anticancer activities. *Acta Pharmaceutica*, vol. 68, no. 3, pp. 251-273. <http://dx.doi.org/10.2478/acph-2018-0026>. PMID:31259695.
- HADACEK, F. and GREGER, H., 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, vol. 11, no. 3, pp. 137-147. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I).
- HASSANMOGHADAM, F., SHOKOHI, T., HEDAYATI, M.T., ASLANI, N., HAGHANI, I., NABILI, M., LOTFALI, E. and MOAZENI, M., 2019. High prevalence of itraconazole resistance among *Candida parapsilosis* isolated from Iran. *Current Medical Mycology*, vol. 5, no. 3, pp. 43-46. <http://dx.doi.org/10.18502/cmm.5.3.1746>. PMID:31850396.
- HOOD, J.R., WILKINSON, J.M. and CAVANAGH, H.M., 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *The Journal of Essential Oil Research*, vol. 15, no. 6, pp. 428-433. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2003.9698631>.
- JAIN, A., RAWAT, S.K. and RAI, A., 2017. Rising incidence of non-*albicans Candida* and changing susceptibility pattern of bloodstream *Candida* Isolates in neonates. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol. 11, no. 11. <http://dx.doi.org/10.7860/JCDR/2017/29492.10804>.
- KATKE, S., AMRUTKAR, S., BHOR, R. and KHAIRNAR, M., 2011. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/aryl acetamide derivatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 2, no. 7, pp. 148-156.
- KNEALE, M., BARTHOLOMEW, J.S., DAVIES, E. and DENNING, D.W., 2016. Global access to antifungal therapy and its variable cost. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 71, no. 12, pp. 3599-3606. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw325>. PMID:27516477.
- LAMOTH, F., LOCKHART, S.R., BERKOW, E.L. and CALANDRA, T., 2018. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, suppl. 1, pp. i4-i13. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx444>. PMID:29304207.
- LOHSE, M.B., GULATI, M., CRAIK, C.S., JOHNSON, A.D. and NOBILE, C.J., 2020. Combination of antifungal drugs and protease inhibitors prevent *Candida albicans* biofilm formation and disrupt mature biofilms. *bioRxiv*, vol. 11, pp. 1027. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01027>. PMID:32523574.
- NCUBE, N., AFOLAYAN, A. and OKOH, A., 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 12, pp. 1797-1806. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB07.613>.
- NETT, J.E. and ANDES, D.R., 2020. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *Journal of Fungi*, vol. 6, no. 1, pp. 21. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6010021>. PMID:32028622.

- NETT, J.E., 2014. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 12, no. 3, pp. 375–382. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2014.885838>. PMID:24506174.
- ODDS, F.C., 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, no. 1, pp. 1. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg301>. PMID:12805255.
- OLAECHEA, P.M., PALOMAR, M., LEÓN-GIL, C., ÁLVAREZ-LERMA, F., JORDÁ, R., NOLLA-SALAS, J. and LEÓN-REGIDOR, M.A., 2004. Economic Impact of *Candida* Colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 23, no. 4, pp. 323–330. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-004-1104-x>. PMID:15024623.
- PATEL, N.B. and SHAIKH, A.R., 2011. Synthesis of new 1,3-oxazolyl-7-chloroquinazolin-4 (3H) ones and evaluation of their antimicrobial activities. *Acta Poloniae Pharmaceutica* vol. 68, no. 2, pp. 223–230. PMID:21485295.
- PEIXOTO, I.N., SOUZA, H.D., LIRA, B.F., SILVA, D.F., LIMA, E.O., BARBOSA-FILHO, J.M. and ATHAYDE-FILHO, P.F., 2016. Synthesis and antifungal activity against *Candida* strains of mesoionic system derived from 1, 3-thiazolium-5-thiolate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 27, no. 10, pp. 1807–1813.
- PEREIRA, F.O., MENDES, J.M., LIMA, I.O., MOTA, K.S.L., OLIVEIRA, W.A. and LIMA, E.O., 2015. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, vol. 53, no. 2, pp. 228–234. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.913299>. PMID:25414073.
- RAJASEKHARAN, S.K., RAMESH, S., SATISH, A.S. and LEE, J., 2017. Antibiofilm and anti- β -lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 3, pp. 542–551. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1609.09043>. PMID:27974734.
- REINHARDT, L.C., NASCENTE, P.S., RIBEIRO, J.S., GUIMARÃES, V.B.S., ETGES, A. and LUND, R.G., 2020. Sensitivity to antifungals by *Candida* spp samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 80, no. 2, pp. 266–272. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.190454>. PMID:31291399.
- SALIE, F., EAGLES, P.F.K. and LENG, H.M.J., 1996. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 52, no. 1, pp. 27–33. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01381-5](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(96)01381-5). PMID:8733116.
- SCHACHT, V., NEUMANN, L., SANDHI, S., CHEN, L., HENNING, T., KLAR, P., THEOPHEL, K., SCHNELL, S. and BUNGE, M., 2013. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 114, no. 1, pp. 25–35. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12000>. PMID:22943489.
- SHIN, S., 2003. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. *Archives of Pharmacol Research*, vol. 26, no. 5, pp. 389–393. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02976696>. PMID:12785735.
- SIDDIQUI, Z.N., FAROOQ, F., MUSTHAFA, T.N.M., AHMAD, A. and KHAN, A.U., 2013. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 17, no. 2, pp. 237–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.03.016>.
- 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. and LIMA, E., 2020. (R)-(+)- β -Citronellol and (S)-(–)- β -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* Spp. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 5, pp. 1785. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21051785>. PMID:32150884.
- SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D.W. and AZEREDO, J., 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 288–305. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>. PMID:21569057.
- STEIN, C., MAKAREWICZ, O., FORSTNER, C., WEIS, S., HAGEL, S., LÖFFLER, B. and PLETZ, M., 2016. Should daptomycin–rifampin combinations for MSSA/MRSA isolates be avoided because of antagonism? *Infection*, vol. 44, no. 4, pp. 499–504. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-016-0874-2>. PMID:26797915.
- STEVENSON, K., MCVEY, A.F., CLARK, I.B., SWAIN, P.S. and PILIZOTA, T., 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 38828. <http://dx.doi.org/10.1038/srep38828>. PMID:27958314.
- SUN, M., CHEN, C., XIAO, W., CHANG, Y., LIU, C. and XU, Q., 2019. Increase in *Candida parapsilosis* candidemia in cancer patients. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, vol. 11, no. 1, pp. e2019012. <http://dx.doi.org/10.4084/mjhid.2019.012>. PMID:30671218.
- TÓTH, R., NOSEK, J., MORA-MONTES, H.M., GABALDON, T., BLISS, J.M., NOSANCHUK, J.D., TURNER, S.A., BUTLER, G., VÁGVÖLGYI, C. and GÁCSEK, A., 2019. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 2, pp. e00111–e00118. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00111-18>. PMID:30814115.
- TSUI, C., KONG, E.F. and JABRA-RIZK, M.A., 2016. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathogens and Disease*, vol. 74, no. 4, pp. ftw018.
- VALGUS, J.M., 2003. What's new in antifungals? *Current Infectious Disease Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 16–21. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-003-0060-4>. PMID:12525286.
- VIEIRA, J.N., FEIJÓ, A.M., BUENO, M.E., GONÇALVES, C.L., LUND, R.G., MENDES, J.F., VILLARREAL, J.P.V., VILLELA, M.M. and NASCENTE, P.S., 2018. Evaluation of the frequency of *Candida* spp. in hospitalized and non-hospitalized subjects. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 78, no. 4, pp. 644–652. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.169623>. PMID:29451605.
- YADAV, S., LIM, S.M., RAMASAMY, K., VASUDEVAN, M., SHAH, S.A.A., MATHUR, A. and NARASIMHAN, B., 2018. Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of 2-(1-benzoyl-1 H-benzo [d] imidazol-2-ylthio)-N-substituted acetamides. *Chemistry Central Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 66. <http://dx.doi.org/10.1186/s13065-018-0432-3>. PMID:29804151.
- ZACCHINO, S., 2001. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: R.A. YUNES, ed. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, pp. 435–479.
- ZUPANČIČ, J., BABIČ, M.N. and GUNDE-CIMERMAN, N., 2018. High incidence of an emerging opportunistic pathogen *Candida parapsilosis* in water-related domestic environments. In: E.S. LORETO and J.S.M. TONDOLO, eds. *Fungal infection*. London: IntechOpen.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, apresentados e discutidos, pode-se concluir que a substância 2-cloro-*N*-fenilacetamida:

- Possui atividade antifúngica frente a *C. albicans* e *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol, com potencial fungicida sobre algumas linhagens;
- Apresenta antagonismo ao ser combinada com anfotericina B, limitando sua aplicação terapêutica como estratégia combinatória;
- Não exerce seu efeito por ligação com ergosterol membranar ou por alteração da integridade da parede celular fúngica, permanecendo seu real mecanismo de ação ainda passível de investigação para ser melhor compreendido.
- Inibe o crescimento das leveduras em função do tempo de forma constante independente da concentração utilizada.
- Inibe a formação de biofilme fúngico, bem como perturba a estabilidade do biofilme maduro, atestando sua eficácia contra estruturas de resistência microbiana.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-ZAPATA, D.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_6, p. S604–S611, 1 dez. 2015.
- ALVAREZ-MORENO, C. A.; CORTES, J. A.; DENNING, D. W. Burden of Fungal Infections in Colombia. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 41, 2018.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400, 2014.
- ARENDROP, M. et al. EUCAST definitive document E. Def 7.3.1. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.**, n. 7.3.1, 2017.
- ASADZADEH, M. et al. Epidemiology and molecular basis of resistance to fluconazole among clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 8, p. 966–972, 2017.
- ASCHALE, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. **Int. J. ChemTech. Res**, v. 4, p. 1437–1441, 2012.
- BALASUBRAMANIAN, D. et al. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. **PloS one**, v. 7, n. 3, 2012.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, abr. 2016.
- BENEDICT, K.; WHITHAM, H. K.; JACKSON, B. R. **Economic Burden of Fungal Diseases in the United States**. . Em: OPEN FORUM INFECTIOUS DISEASES. Oxford University Press US, 2022.
- BIBI, N. et al. Drug repositioning against COVID-19: a first line treatment. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–15, 14 set. 2021.
- BOHNER, F.; PAPP, C.; GÁCSE, A. The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foac019, 2022.
- BRASIL, M. DA S. **Candidíase Sistêmica**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistemica>>. Acesso em: 10 ago. 2022.
- BRUNO, A. et al. The In Silico Drug Discovery Toolbox: Applications in Lead Discovery and Optimization. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 21, p. 3838–3873, 2019.

CANELA, H M S et al. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 22 set. 2017.

CAROLUS, H. et al. Amphotericin b and other polyenes—Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 9, p. 1284–1292, 2013.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739–787, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. **CLSI document M27-A3 and Supplement S**, n. 3, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

CORDEIRO, L. et al. Potential of 2-Chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide Against *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Toxicity Analysis. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3959, 2020.

CORTÉS, J. A.; CORRALES, I. F. Invasive candidiasis: epidemiology and risk factors. Em: **Fungal Infection**. [s.l.] IntechOpen, 2018.

CRUNDEN, J. L.; DIEZMANN, S. Hsp90 interaction networks in fungi—tools and techniques. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 7, p. foab054, 2021.

DA ROSA MONTE MACHADO, G. et al. A chloroacetamide derivative as a potent candidate for fusariosis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–7, 2022.

DA SILVA RUIZ, L. et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children’s hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 231–239, 2013.

DE ARAÚJO, R. S. et al. Synthesis, structure-activity relationships (SAR) and in silico studies of coumarin derivatives with antifungal activity. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 1293–1309, 2013.

DE CÁSSIA ORLANDI SARDI, J. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology and risk factors, pathogenesis, resistance, and new therapeutic options. **Current Fungal Infection Reports**, v. 15, n. 1, p. 32–40, 2021.

DEMIRCI-DUARTE, S.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; GÜLMEZ, D. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis*

complex isolates: increase in fluconazole resistance in 21 years. **Mycoses**, v. 64, n. 8, p. 823–830, 2021.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DUNKER, C. et al. Rapid proliferation due to better metabolic adaptation results in full virulence of a filament-deficient *Candida albicans* strain. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2021.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta medica**, v. 64, n. 08, p. 711–713, 1998.

ENOCH, D. A. et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols**, p. 17–65, 2017.

ESCALANTE, A. et al. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of natural products**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725, 2008.

FERNANDES, B. F. et al. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v. 5, n. 9, 2019.

FERREIRA, E. S. et al. Antifungal activity and mechanism of action of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with activity against strains of *Aspergillus flavus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.

FRANCO, C. M.; VÁZQUEZ, B. I. Natural Compounds as Antimicrobial Agents. 2020.

FROST, D. J. et al. 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.

GALLARDO-GODOY, A. et al. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 3, p. 1068–1077, 2016.

GAMALETSOU, M. N.; WALSH, T. J.; SIPSAS, N. V. Invasive Fungal Infections in Patients with Hematological Malignancies: Emergence of Resistant Pathogens and New Antifungal Therapies. **Turkish Journal of Hematology**, v. 35, n. 1, p. 1, 2018.

GAMARRA, F.; NUCCI, M.; NOUÉR, S. A. Evaluation of a stewardship program of antifungal use at a Brazilian tertiary care hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, 2022.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GOUDA, A. M. et al. Pyrrolizine-5-carboxamides: Exploring the impact of various substituents on the anti-inflammatory and anticancer activities. **Acta Pharmaceutica**, v. 68, n. 3, p. 251–273, 2018.

HAAS, M. et al. Identification of cryptic *Candida* species by MALDI-TOF mass spectrometry, not all MALDI-TOF systems are the same: focus on the *C. parapsilosis* species complex. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 4, p. 385–386, 2016.

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

HARE, R. K. et al. Candidemia among Hospitalized Pediatric Patients Caused by Several Clonal Lineages of *Candida parapsilosis*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 1–11, 2022.

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

ITO, K. Inhaled antifungal therapy: benefits, challenges, and clinical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, n. just-accepted, 2022.

JACOBSEN, I. D.; HUBE, B. *Candida albicans* morphology: still in focus. 2017.

JAIN, A.; RAWAT, S. K.; RAI, A. Rising Incidence of Non-*albicans* *Candida* and Changing Susceptibility Pattern of Bloodstream *Candida* Isolates in Neonates. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 11, n. 11, 2017.

KAMIŃSKI, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European biophysics journal**, v. 43, n. 10–11, p. 453–467, 2014.

KATKE, S. et al. 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.

KIM, W. et al. A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. **Nature**, v. 556, n. 7699, p. 103–107, 2018.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KLEPSEK, M. E. et al. Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1917–1920, 2000.

KOC, Ö. et al. Performance of Multiplex PCR and β -1, 3-D-Glucan Testing for the Diagnosis of Candidemia. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 9, p. 972, 2022.

KRONEN, R. et al. Risk Factors and Mortality Associated with *Candida krusei* Bloodstream Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. suppl_1, p. S74–S75, 1 out. 2017.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl_1, p. i4–i13, 2018.

LOHSE, M. B. et al. Combination of antifungal drugs and protease inhibitors prevent *Candida albicans* biofilm formation and disrupt mature biofilms. **bioRxiv**, 2020.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.

MA, X. et al. Genotoxicity of chloroacetamide herbicides and their metabolites in vitro and in vivo. **International journal of molecular medicine**, v. 47, n. 6, p. 1–10, 2021.

MACHADO, G. DA R. M. et al. Chloroacetamide derivatives as a promising topical treatment for fungal skin infections. **Mycologia**, v. 111, n. 4, p. 612–623, 2019.

MARCOS-ARIAS, C. et al. Utility of two PCR-RFLP-based techniques for identification of *Candida parapsilosis* complex blood isolates. **Mycoses**, v. 63, n. 5, p. 461–470, 2020.

MARINS, T. A. et al. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, p. 187, 2018.

MEDEIROS, M. A. P. DE et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MONDAY, L. M.; PARRAGA ACOSTA, T.; ALANGADEN, G. T2Candida for the diagnosis and management of invasive candida infections. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 178, 2021.

MONI, M. et al. A quality improvement initiative to improve the appropriateness of candidemia management by the implementation of a comprehensive candidemia care bundle at a tertiary care hospital in South India: Results of a quasi-experimental study. **Medicine**, v. 101, n. 13, 2022.

MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics-A Highway to New Drugs or a Dead End? **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1378–1388, 2012.

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

NETT, J. E. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 3, p. 375–382, 2014.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 21, 2020.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 1 jul. 2003.

ONSARE, J.; ARORA, D. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 2, p. 313–325, 2015.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 2018.

PATEL, N. B.; SHAIKH, A. R. Synthesis of new 1, 3-oxazolyl-7-chloroquinazolin-4 (3H) ones and evaluation of their antimicrobial activities. **Acta Pol. Pharm. Drug Res**, v. 68, p. 223–230, 2011.

PEREIRA, F. DE O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228–234, fev. 2015.

PINTO-MAGALHÃES, S. et al. Candidemia in a Portuguese tertiary care hospital: Analysis of a 2-year period. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, n. 4, p. 320–324, 2019.

RAJASEKHARAN, S. K. et al. Antibiofilm and anti- β -lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 542–551, 2017.

RAYENS, E.; NORRIS, K. A. **Prevalence and healthcare burden of fungal infections in the United States, 2018**. . Em: OPEN FORUM INFECTIOUS DISEASES. Oxford University Press US, 2022.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Antimicrobials * Microbial systems biology**, v. 45, p. 70–76, 1 out. 2018.

RIERA, F. O. et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 877, 2022.

RISANDY, D. A. et al. Predicting Candida Infection in Pediatric Intensive Care Unit using Candida Score in a Low-Resource Setting. **Global Pediatric Health**, v. 8, p. 2333794X21999152, 2021.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. Em: **Advances in Clinical Immunology, Medical Microbiology, COVID-19, and Big Data**. [s.l.] Jenny Stanford Publishing, 2021. p. 399–411.

ROUZÉ, A.; ESTELLA, Á.; TIMSIT, J.-F. Is (1, 3)- β -D-glucan useless to guide antifungal therapy in ICU? **Intensive Care Medicine**, p. 1–3, 2022.

RUDRAMURTHY, S. M.; SINGH, S. Candida infections in immunocompetent hosts: pathogenesis and diagnosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, n. 3, p. 233–245, 2020.

RUIZ-BACA, E. et al. Molecular mechanisms of resistance to antifungals in Candida albicans. **Advances in Candida albicans**, p. 39, 2021.

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

SEAGLE, E. E. et al. The landscape of candidemia during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 5, p. 802–811, 2022.

SHIN, S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 5, p. 389, 1 maio 2003.

SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237–243, 1 abr. 2013.

SILVA, S. et al. Candida species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 8, 2017.

SOUZA, H. D. et al. Synthesis, in silico study and antimicrobial evaluation of new selenoglycolicamides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 188–197, 2019.

SUN, M. et al. Increase in Candida parapsilosis candidemia in cancer patients. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 11, n. 1, 2019.

SZYMAŃSKI, M. et al. Echinocandins—structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876–894, 2022.

TALAPKO, J. et al. Candida albicans—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAVANTI, A. et al. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, 2005.

THOMAS-RÜDDEL, D. et al. Risk factors for invasive candida infection in critically ill patients-a systematic review and meta-analysis. **Chest**, 2021.

THOMAZ, D. Y. et al. A Brazilian Inter-Hospital Candidemia Outbreak Caused by Fluconazole-Resistant Candida parapsilosis in the COVID-19 Era. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 100, 2022.

THOMSON, P. et al. Combined antifungal therapy against systemic murine infections by rare Cryptococcus species. **Mycoses**, v. 60, n. 2, p. 112–117, 2017.

TIGEN, E. T. et al. Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey. **American journal of infection control**, v. 45, n. 6, p. e61–e63, 2017.

TÓTH, R. et al. Candida parapsilosis: from genes to the bedside. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. e00111-18, 2019.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of Candida albicans biofilm. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

VALGUS, J. M. What's new in antifungals? **Current infectious disease reports**, v. 5, n. 1, p. 16–21, 2003.

VITALE, R. G. Role of Antifungal Combinations in Difficult to Treat Candida Infections. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 731, 6 set. 2021.

WANG, Y. et al. Antifungal agents for invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill adults: What do the guidelines recommend? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 89, p. 137–145, 2019.

XISTO, M. I. D. S. et al. Pan-azole-resistant Candida tropicalis carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: a new emerging superbug? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 988–992, 1 abr. 2017.

XU, Z. et al. Regulatory network controls microbial biofilm development, with Candida albicans as a representative: From adhesion to dispersal. **Bioengineered**, v. 13, n. 1, p. 253–267, 2022.

YADAV, S. et al. Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of 2-(1-benzoyl-1 H-benzo [d] imidazol-2-ylthio)-N-substituted acetamides. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 66, 2018.

YANG, W. et al. Role of Azole Drugs in Promoting Fungal Cell Autophagy Revealed by an NIR Fluorescence-Based Theranostic Probe. **Analytical Chemistry**, 2022.

YOO, J. et al. Candidemia risk prediction (CanDETEC) model for patients with malignancy: model development and validation in a single-center retrospective study. **JMIR medical informatics**, v. 9, n. 7, p. e24651, 2021.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Ed. Argos, p. 435–479, 2001.

ZUPANČIČ, J.; BABIČ, M. N.; GUNDE-CIMERMAN, N. High Incidence of an Emerging Opportunistic Pathogen *Candida parapsilosis* in Water-Related Domestic Environments. Em: **Fungal Infection**. [s.l.] IntechOpen, 2018.

APÊNDICES – CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Antifungal activity of 2-chloro-*N*-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp.

Atividade antifúngica de 2-cloro-*N*-fenilacetamida: uma nova molécula com atividade fungicida e anti-biofilme contra *Candida* spp. resistentes a fluconazol

H. Diniz-Neto^{a*}, S. L. Silva^a, L. V. Cordeiro^a, D. F. Silva^a, R. F. Oliveira^b, P. F. Athayde-Filho^b, A. A. Oliveira-Filho^c, F. Q. S. Guerra^a and E. O. Lima^a

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Pharmaceutical Sciences – DCF, João Pessoa, PB, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Chemistry – DQ, João Pessoa, PB, Brasil

^cUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Rural Health and Technology Center – CTSR, Patos, PB, Brasil

Abstract

In the current context of emerging drug-resistant fungal pathogens such as *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, discovery of new antifungal agents is an urgent matter. This research aimed to evaluate the antifungal potential of 2-chloro-*N*-phenylacetamide against fluconazole-resistant clinical strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The antifungal activity of 2-chloro-*N*-phenylacetamide was evaluated *in vitro* by the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), inhibition of biofilm formation and its rupture, sorbitol and ergosterol assays, and association between this molecule and common antifungal drugs, amphotericin B and fluconazole. The test product inhibited all strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, with a MIC ranging from 128 to 256 µg.mL⁻¹, and a MFC of 512-1,024 µg.mL⁻¹. It also inhibited up to 92% of biofilm formation and rupture of up to 87% of preformed biofilm. 2-chloro-*N*-phenylacetamide did not promote antifungal activity through binding to cellular membrane ergosterol nor it damages the fungal cell wall. Antagonism was observed when combining this substance with amphotericin B and fluconazole. The substance exhibited significant antifungal activity by inhibiting both planktonic cells and biofilm of fluconazole-resistant strains. Its combination with other antifungals should be avoided and its mechanism of action remains to be established.

Keywords: antifungal drug resistance, antifungal susceptibility, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, invasive candidiasis.

Resumo

No atual contexto de patógenos fúngicos resistentes emergentes tais como *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, a descoberta de novos agentes antifúngicos é uma questão urgente. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico da 2-cloro-*N*-fenilacetamida contra cepas clínicas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol. A atividade antifúngica da substância foi avaliada *in vitro* através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), ruptura e inibição da formação de biofilme, ensaios de sorbitol e ergosterol, e associação entre esta molécula e antifúngicos comuns, anfotericina B e fluconazol. O produto teste inibiu todas as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com uma CIM variando de 128 a 256 µg.mL⁻¹, e uma CFM de 512-1,024 µg.mL⁻¹. Também inibiu até 92% da formação de biofilme e causou a ruptura de até 87% de biofilme pré-formado. A 2-cloro-*N*-fenilacetamida não promoveu atividade antifúngica pela ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, tampouco danificou a parede celular. Antagonismo foi observado ao combinar esta substância com anfotericina B e fluconazol. A substância exibiu atividade antifúngica significativa ao inibir tanto as células planctônicas quanto o biofilme das cepas resistentes ao fluconazol. Sua combinação com outros antifúngicos deve ser evitada e seu mecanismo de ação deve ser estabelecido.

Palavras-chave: resistência antifúngica, susceptibilidade antifúngica, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, candidíase invasiva.

*e-mail: hermes.dn@hotmail.com

Received: August 5, 2021 – Accepted: January 19, 2022



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Journal of Applied Microbiology / Volume 132, Issue 5 / p. 3601-3617

ORIGINAL ARTICLE

Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide, docking and molecular dynamics studies against clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*

Shellygton Lima Silva ✉, Fillipe de Oliveira Pereira, Laisa Vilar Cordeiro, Hermes Diniz Neto, Mayara dos Santos Maia, Helivaldo Diogenes da Silva Souza ... [See all authors](#) ✓

First published: 18 February 2022

<https://doi.org/10.1111/jam.15498>

Citations: 1

Abstract

Aims

This study evaluated the antifungal, antibiofilm and molecular docking of 2-chloro-N-phenylacetamide against clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*.

Methods and results

Minimum inhibitory concentration (MIC) of the test drugs was determined by microdilution. A1CI obtained MIC values ranging from 16 and 256 µg/ml. Fluconazole MIC ranging from 16 and 512 µg/ml. MIC of A1CI showed fungicide activity, emphasizing the solid antifungal potential of this drug. An association study was performed with A1CI and fluconazole (checkerboard), revealing indifference by decreasing. Thus, we conducted this study using A1CI isolated. In the micromorphological assay, the test drugs reduced the production of virulence structures compared to the control (concentration-dependent effect). A1CI inhibited in vitro biofilm formation at all concentrations tested (1/4MIC to 8 × MIC) ($p < 0.05$) and reduced mature biofilm biomass ($p < 0.05$) against *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. In the ex vivo biofilm susceptibility testing (human nails fragments), A1CI inhibited biofilm formation and reduced mature biofilm biomass ($p < 0.05$) more than 50% at MIC. Fluconazole had a similar effect at 4 × MIC. In silico studies suggest that the mechanism of antifungal activity of A1CI involves the inhibition of the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) rather than geranylgeranyltransferase-I.

Conclusions

The results suggest that A1CI is a promising antifungal agent. Furthermore, this activity is related to attenuation of expression of virulence factors and antibiofilm effects against *C.*

In silico and *in vitro* analysis of a new potential antifungal substance, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, against invasive candidiasis isolates

Romulo Pereira de Moura Sousa¹, Daniele de Figuerêdo Silva¹, Neuza Maria Cavalcante Oliveira¹, Zélia Braz Vieira Da Silva Pontes¹, Hermes Diniz Neto¹, Laisa Vilar Cordeiro^{1*}, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo¹, Rafael Farias de Oliveira², Helivaldo Diógenes da Silva Souza², Petrônio Filgueiras de Athayde Filho², Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

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

* Corresponding author e-mail: laisavilar@gmail.com

Received: September 30, 2020

Corrected: March 24, 2021

Accepted: March 29, 2021

SUMMARY

Introduction: invasive candidiasis is related to high rates of morbidity and mortality. There are few classes of drugs available for the treatment of this type of infection and the index of resistant strains is increasing. Such circumstances highlight that the search for new pharmacotherapeutic alternatives is increasingly necessary. This study investigated 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, a substance whose antifungal activity has not yet been reported. **Objective:** to evaluate its activity against invasive candidiasis isolates, by determining the minimum inhibitory and fungicide concentrations. **Methodology:** molecular docking was performed to investigate the possible mechanism of action of the substance. The substance was also associated with fluconazole, to assess the viability of the combination in clinical practice. The minimum inhibitory concentrations ranged between 4 to 32 µg/mL, and it acts in a fungicidal way. **Results:** molecular docking suggests that 2-Bromo-*N*-phenylacetamide possibly acts on the fungal plasma membrane. And the association of 2-Bromo-*N*-phenylacetamide with fluconazole against resistant strains showed an indifferent effect. **Conclusion:** further studies should be carried out to elucidate the potential of this substance, which may become a future drug candidate to treat invasive candidiasis and other fungal infections.

695

Efeito inibitório de di-hidrojasmona frente cepas de *Candida* spp. fluconazol resistentes

Inhibitory effect of di-hydrojasmonone against strains of *Candida* spp. fluconazole resistant

Efecto inhibidor de la dihidrojasmona contra *Candida* spp. resistente al fluconazol

Recebido: 10/11/2021 | Revisado: 17/11/2021 | Aceito: 19/11/2021 | Publicado: 29/11/2021

Luanna de Oliveira e Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9479-1733>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: luanna.lima@academico.ufpb.br

Larissa Alves Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5073-7033>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: larissa.silva@academico.ufpb.br

Mariana Cavalcante Fonseca

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2889-8321>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: marianacavalcantef@gmail.com

Hermes Diniz-Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2878-1737>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: hermes.dn@ltf.ufpb.br

Edeltrudes de Oliveira Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: edelolima@yahoo.com.br

José Maria Barbosa Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9567-4096>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: jbarbosa@ltf.ufpb.br

Josean Fachine Tavares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0293-2605>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: josean@ltf.ufpb.br

Walcyranson Plínio da Silva-Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-2781>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: wps@academico.ufpb.br

Felipe Queiroga Sarmiento Guerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2057-4821>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: fqsg@academico.ufpb.br

Resumo

Introdução: A candidíase está relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas que se expressam desde infecções na pele e mucosas à infecção sistêmica. Sendo esta última associada a uma alta taxa de mortalidade global, variando de 36% a 63% em diferentes grupos de pacientes. A terapêutica de infecções fúngicas invasivas é limitada pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Diante deste cenário, estratégias de uso racional dos antifúngicos e busca de novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica in vitro do monoterpeno di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* fluconazol resistentes. **Metodologia:** As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicida mínima (CFM) foram determinadas pelo método de microdiluição. Posteriormente foi observado se a ação antifúngica de di-hidrojasmona ocorre via parede celular (ensaio com sorbitol) ou via membrana (ensaio com ergosterol exógeno). **Resultados:** A di-hidrojasmona apresentou uma CIM entre 128 - 256 µg/mL e a CFM teve os mesmos valores de CIM, respectivamente. No ensaio com ergosterol exógeno, a CIM da di-hidrojasmona aumentou na presença do ergosterol exógeno sugerindo que o mecanismo de ação do monoterpeno ocorre a partir de sua ligação ao ergosterol presente na membrana. Não houve alteração frente ao uso do sorbitol. **Conclusão:** Baseado nestes resultados, o presente estudo demonstra que di-hidrojasmona possui forte atividade antifúngica e sugere que esta atividade esteja relacionada a sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Logo, di-hidrojasmona demonstra ser um promissor bioproduto na busca de alternativas para o tratamento das candidíases.

Palavras-chave: Candidíase; Monoterpeno; Produtos naturais; Antifúngico.

Inhibitory Effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp.

Efeito inibitório do (-)-myrtenol sozinho e em combinação com agentes antifúngicos sobre *Candida* spp.

Efecto inhibidor del (-)-myrtenol solo y en combinación con agentes antifúngicos sobre *Candida* spp.

Received: 10/28/2021 | Reviewed: 11/07/2021 | Accept: 11/10/2021 | Published: 11/17/2021

Bruno Bezerra Cavalcanti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7091-4241>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: brunobc@gmail.com

Hermes Diniz-Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2878-1737>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: hermes.dn@hotmail.com

Walicyranison Plínio da Silva-Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-2781>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: wps@academico.ufpb.br

Edeltrudes de Oliveira Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: edelolima@yahoo.com.br

José Maria Barbosa Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9567-4096>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: barbosa.ufpb@gmail.com

Ricardo Dias de Castro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7986-7376>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: rcaastro@ccs.ufpb.br

Fabio Correia Sampaio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2870-5742>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: fcsampa@gmail.com

Felipe Queiroga Sarmento Guerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2057-4821>
 Federal University of Paraíba, Brazil
 E-mail: fqsg@academico.ufpb.br

Abstract

The aim of this study was to examine the effects of (-)-myrtenol alone and combined with antifungal agents against *Candida* spp. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration of (-)-myrtenol and fluconazole against *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains was obtained using CLSI guidelines. Combination of (-)-myrtenol with antifungal drugs was determined by checkboard test. The (-)-myrtenol showed MIC ranging from 256 to 512 µg/mL against both species assay. And the MFC was 512 µg/mL, demonstrated nature fungicidal (MFC/MIC < 4). In addition, combination of antifungal agents (amphotericin B and fluconazole) and (-)-myrtenol showed synergistic and additive effects on strains assays. Based on these results, the present study demonstrates that (-)-myrtenol showed strong fungicide activity against *Candida* spp. In addition, Combination of antifungal agents and (-)-myrtenol reduces the effective concentrations of both the agents with synergistic to additive effects. Therefore, (-)-myrtenol has potential to be developed into an antifungal agent.

Keywords: Monoterpenes; Antifungal activity; Natural products; Alternative therapy.

Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do (-)-mirtenol sozinho e combinado com agentes antifúngicos frente *Candida* spp. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima de (-) - mirtenol e



Synthesis, *in silico* Study and Antimicrobial Evaluation of New Diesters Derived from Phthaloylglycine

Rafael F. de Oliveira,^a Helivaldo D. S. Souza,^a Francinara S. Alves,^a Abraão P. de Sousa,^a
Priscila S. V. de Lima,^a Min-Fu N. Huang,^a Laísa V. Cordeiro,^b Hermes Diniz Neto,^b
Edeltrudes O. Lima,^b Emmely O. Trindade,^a José M. Barbosa-Filho^{a,*b} and
Petrônio F. de Athayde-Filho^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba,
58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

New diesters derived from phthaloylglycine (**7a-7i**) were synthesized and their structures characterized by infrared, ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The compounds were evaluated in an *in silico* study, which demonstrated positive features indicating a possible drug candidate. The diesters showed antifungal activity ranging from moderate to strong against strains of *Candida*. Compounds **7a**, **7b**, **7c**, **7e** and **7i** had a moderate minimum inhibitory concentration (MIC) of 1024 µg mL⁻¹ against all fungal strains, while **7h** showed a very good MIC of 256 µg mL⁻¹ against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* and 64 µg mL⁻¹ against *Candida tropicalis*. However, only **7h** and **7i** were able to inhibit bacterial growth of strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with an MIC of 1024 µg mL⁻¹.

Keywords: phthalimide, phthaloylglycine, antibacterial activity, antifungal activity

Introduction

Multidrug-resistance is posing a great threat to health care services worldwide, where infections caused by resistant bacteria and/or fungi are very difficult to treat, usually leading to therapeutic failure with high mortality rates. The development of new drugs is a prominent alternative in the control of these infections, aiming to prevent or decrease pathogen resistance to achieve better treatment outcomes.^{1,2} Several heterocyclic compounds possess antimicrobial properties and have been studied and evaluated as potential drug candidates. Among such compounds is phthalimide, with a distinct and valuable structure for the design and development of new varieties of drugs.

Phthalimides have an imide ring, which is responsible for their biological activity.³ These molecules have drawn attention because of their versatile range of biological applications including antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory, antiviral, antitumor and anticonvulsant.⁴

It is widely reported that phthalimide is an important biologically active pharmacophore and its derivatives have great antimicrobial activities.⁵⁻⁷

To counter the mechanisms of microbial resistance already known, it is necessary to employ molecular modification strategies such as molecular lipophilicity control, which influences the biological activity of new drug candidates.⁸ This is achieved by altering the number of carbons in the alkyl chain of an ester, for example.

Due to these merits, nine diester compounds derived from phthalimide were synthesized as potential new drug candidates. The compounds initially went through a design stage and *in silico* evaluation, and they were then taken to the organic synthesis stage, and finally tested for antimicrobial activity.

Results and Discussion

Chemical

The synthesis of the target molecules **7a-7i** involved four synthetic stages, which are described in Scheme 1.

*e-mail: jbarbosa@lbf.ufpb.br



Article

(R)-(+)- β -Citronellol and (S)-(-)- β -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* Spp.

Daniele Silva ^{1,*}, Hermes Diniz-Neto ¹, Laís Cordeiro ¹, Maria Silva-Neta ¹, Shellygton Silva ¹, Francisco Andrade-Júnior ¹, Maria Leite ¹, Jefferson Nóbrega ¹, Maria Morais ¹, Juliana Souza ², Lyvia Rosa ¹, Thamara Melo ¹, Helivaldo Souza ², Aleson Sousa ³, Gregório Rodrigues ⁴, Abrahão Oliveira-Filho ⁵ and Edeltrudes Lima ¹

¹ Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil; hermes.dn@hotmail.com (H.D.-N.); laisavilar@gmail.com (L.C.); neves_neta@hotmail.com (M.S.-N.); shellygton@hotmail.com (S.S.);

juniorfarmacia.ufcg@outlook.com (F.A.-J.); deniseaiana@yahoo.com.br (M.L.); jeffersonrodriguesn@hotmail.com (J.N.); frannciellysimoes@gmail.com (M.M.);

lyvinhasr14@hotmail.com (L.R.); th.rmelotf.ufpb.br (T.M.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)

² Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil;

julianakelly71@gmail.com (J.S.); helivaldog3@gmail.com (H.S.)

³ Postgraduate Program in Drug Development and Technological Innovation, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil; aleson_155@hotmail.com

⁴ Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil; gregorio_marcio1@yahoo.com.br

⁵ Health and Rural Technology Center, Federal University of Campina Grande, Patos 58700-970, Brazil; abrahao.farm@gmail.com

* Correspondence: danielieferredo31@gmail.com; Tel.: +55-83-99981-1977

Received: 13 December 2019; Accepted: 13 January 2020; Published: 5 March 2020



Abstract: The enantiomers (R)-(+)- β -citronellol and (S)-(-)- β -citronellol are present in many medicinal plants, but little is understood about their bioactivity against *Candida* yeasts. This study aimed to evaluate the behavior of positive and negative enantiomers of β -citronellol on strains of *Candida albicans* and *C. tropicalis* involved in candidemia. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) were determined. The evaluation of growth kinetics, mechanism of action, and association studies with Amphotericin B (AB) using the checkerboard method was also performed. R-(+)- β -citronellol and S-(-)- β -citronellol presented a MIC_{50%} of 64 μ g/mL and a MFC_{50%} of 256 μ g/mL for *C. albicans* strains. For *C. tropicalis*, the isomers exhibited a MIC_{50%} of 256 μ g/mL and a MFC_{50%} of 1024 μ g/mL. In the mechanism of action assay, both substances displayed an effect on the fungal membrane but not on the fungal cell wall. Synergism and indifference were observed in the association of R-(+)- β -citronellol and AB, while the association between S-(-)- β -citronellol and AB displayed synergism, additivity, and indifference. In conclusion, both isomers of β -citronellol presented a similar profile of antifungal activity. Hence, they can be contemplated in the development of new antifungal drugs providing that further research is conducted about their pharmacology and toxicity.

Keywords: isomers; (R)-(+)- β -citronellol; (S)-(-)- β -citronellol; *candida* spp.; antifungal activity

Article

Potential of 2-Chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide Against *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Toxicity Analysis

Laísa Cordeiro ^{1,*} , Hermes Diniz-Neto ¹ , Pedro Figueiredo ¹, Helivaldo Souza ² , Aleson Sousa ¹ , Francisco Andrade-Júnior ¹, Thamara Melo ¹, Elba Ferreira ¹ , Rafael Oliveira ², Petrónio Athayde-Filho ², José Barbosa-Filho ¹ , Abrahão Oliveira-Filho ³ and Edeltrudes Lima ¹

- ¹ Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455 João Pessoa, Paraíba, Brazil; hermes.dn@hotmail.com (H.D.-N.); pedrotrfigueiredo@gmail.com (P.F.); aleson_155@hotmail.com (A.S.); juniorfarmacia.ufcg@outlook.com (F.A.-J.); th.rmelo@outlook.com (T.M.); elbaferreira99@gmail.com (E.F.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.B.-F.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)
 - ² Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455 João Pessoa, Brazil; helivaldog3@gmail.com (H.S.); rfarias.quimica@gmail.com (R.O.); athayde-filho@quimica.ufpb.br (P.A.-F.)
 - ³ Rural Health and Technology Center, Federal University of Campina Grande, 58708-110 Patos, Brazil; abrahao.farm@gmail.com
- * Correspondence: laisavilar@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7347

Received: 9 July 2020; Accepted: 21 July 2020; Published: 31 August 2020

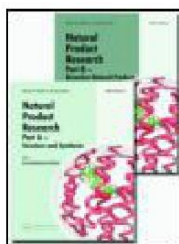


Abstract: *Klebsiella pneumoniae* causes a wide range of community and nosocomial infections. The high capacity of this pathogen to acquire resistance drugs makes it necessary to develop therapeutic alternatives, discovering new antibacterial molecules. Acetamides are molecules that have several biological activities. However, there are no reports on the activity of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide. Based on this, this study aimed to investigate the in vitro antibacterial activity of this molecule on *K. pneumoniae*, evaluating whether the presence of the chloro atom improves this effect. Then, analyzing its antibacterial action more thoroughly, as well as its cytotoxic and pharmacokinetic profile, in order to contribute to future studies for the viability of a new antibacterial drug. It was shown that the substance has good potential against *K. pneumoniae* and the chloro atom is responsible for improving this activity, stabilizing the molecule in the target enzyme at the site. The substance possibly acts on penicillin-binding protein, promoting cell lysis. The analysis of cytotoxicity and mutagenicity shows favorable results for future in vivo toxicological tests to be carried out, with the aim of investigating the potential of this molecule. In addition, the substance showed an excellent pharmacokinetic profile, indicating good parameters for oral use.

Keywords: 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide; *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial; toxicity; minimum inhibitory concentration

1. Introduction

The *Klebsiella pneumoniae* bacteria, belonging to the Enterobacteriaceae family, are Gram-negative, facultative, immobile, and encapsulated anaerobes. It is one of the opportunistic pathogens of greatest clinical relevance, known to be associated with nosocomial infections. It is estimated that this species, alone, is responsible for approximately one third of all infections caused by Gram-negative bacteria in general, causing, for example, pneumonia, urinary tract infections, bacteremia, endocarditis, and liver



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

The impact that β -citronellol isomers have on the biofilm formation of *Candida* yeasts

Daniele de Figueredo Silva , Laísa Vilar Cordeiro , Pedro Thiago Ramalho Figueiredo , Hermes Diniz-Neto , Helivaldo Diógenes da Silva Souza & Edeltrudes de Oliveira Lima

To cite this article: Daniele de Figueredo Silva , Laísa Vilar Cordeiro , Pedro Thiago Ramalho Figueiredo , Hermes Diniz-Neto , Helivaldo Diógenes da Silva Souza & Edeltrudes de Oliveira Lima (2020): The impact that β -citronellol isomers have on the biofilm formation of *Candida* yeasts, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2020.1813131](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813131)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813131>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 25 Sep 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>



Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Gastroenterol 2020 November 21; 26(43): 6795-6809

DOI: 10.3748/wjg.v26.i43.6795

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Basic Study

Antifungal activity and antidiarrheal activity via antimotility mechanisms of (-)-fenchone in experimental models

Michelle Liz de Souza Pessoa, Leiliane Macena Oliveira Silva, Maria Elaine Cristina Araruna, Catarina Alves de Lima Serafim, Edvaldo Balbino Alves Júnior, Alessa Oliveira Silva, Matheus Marley Bezerra Pessoa, Hermes Diniz Neto, Edeltrudes de Oliveira Lima, Leônia Maria Batista

ORCID number: Michelle Liz de Souza Pessoa 0000-0003-4111-3258; Leiliane Macena Oliveira Silva 0000-0002-3932-1464; Maria Elaine Cristina Araruna 0000-0001-7317-7446; Catarina Alves de Lima Serafim 0000-0002-2464-5840; Edvaldo Balbino Alves Júnior 0000-0002-3311-1247; Alessa Oliveira Silva 0000-0002-9573-3869; Matheus Marley Bezerra Pessoa 0000-0002-4086-946X; Hermes Diniz Neto 0000-0003-2878-1737; Edeltrudes de Oliveira Lima 0000-0002-9547-0886; Leônia Maria Batista 0000-0002-5001-2486.

Author contributions: Pessoa MLS, Silva LMO, Araruna MEC, Serafim CAL, Alves Júnior EB, Silva AO, Pessoa MMB, and Batista LM contributed to the conception and design of the study, performed the *in vivo* experiments, coordinated the study, participated in writing the manuscript and approved the final version to be published; Diniz Neto H and de Oliveira Lima E acted as contributors to the evaluation of antimicrobial activity.

Institutional review board statement: The study was reviewed and approved by the Commission for Ethics in Animal Experimentation (CEUA) of the

Michelle Liz de Souza Pessoa, Leiliane Macena Oliveira Silva, Maria Elaine Cristina Araruna, Catarina Alves de Lima Serafim, Edvaldo Balbino Alves Júnior, Alessa Oliveira Silva, Hermes Diniz Neto, Edeltrudes de Oliveira Lima, Department of Pharmaceutical Sciences, IPEFarM, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Paraíba, Brazil

Matheus Marley Bezerra Pessoa, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Paraíba, Brazil

Leônia Maria Batista, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

Corresponding author: Leônia Maria Batista, PharmD, Associate Professor, Professor, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, João Pessoa 58051-900, Brazil. leoniab@uol.com.br

Abstract

BACKGROUND

(-)-Fenchone is a bicyclic monoterpene present in essential oils of plant species, such as *Foeniculum vulgare* and *Peunus boldus*, used to treatment of gastrointestinal diseases. Pharmacological studies report its anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive activity.

AIM

To investigate antidiarrheal activity related to gastrointestinal motility, intestinal secretion and antimicrobial activity.

METHODS

A castor oil-induced diarrhea model was used to evaluate antidiarrheal activity. Intestinal transit and gastric emptying protocols were used to assess a possible antimotility effect. Muscarinic receptors, presynaptic α_2 -adrenergic and tissue adrenergic receptors, K_{ATP} channels, nitric oxide were investigated to uncover antimotility mechanisms of action and castor oil-induced enteropooling to elucidate antisecretory mechanisms. The antimicrobial activity was evaluated in the minimum inhibitory concentration model, the fractional inhibitory

Research, Society and Development, v. 9, n. 8, e561985775, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5775>

Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados clínicos obtidos de onicomicose aos antifúngicos convencionais

Antifungal sensitivity profile of clinical isolates obtained from onychomycosis to conventional antifungals

Perfil de sensibilidad antifúngica de aislados clínicos obtenidos de onicomicosis a antifúngicos convencionales

Recebido: 18/06/2020 | Revisado: 01/07/2020 | Aceito: 04/07/2020 | Publicado: 17/07/2020

Shellygton Lima Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7168-7725>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: shellygton.lima@gmail.com

Maísa Evangelista de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7246-4643>

Centro Universitário UNIFACISA, Brasil

E-mail: maisaevidl@gmail.com

Raissa Daniel Trajano dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2209-8710>

Centro Universitário UNIFACISA, Brasil

E-mail: raissadtrajano@gmail.com

Hermes Diniz Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2878-1737>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: hermes.dn@hotmail.com

Daniele de Figueredo Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9939-0410>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: danielefigueredo31@gmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: edelolima@yahoo.com.br



Estudo de atividade antimicrobiana de 3,4-(metilenodióxi)-acetofenona

Study of the antimicrobial activity of 3,4-(methylenedioxy)-acetophenone

H. Diniz Neto^{1*}; J. R. Nóbrega¹; G. D. Duarte²; F. V. P. Borges¹; J. M. Barbosa Filho¹; L. C. Rodrigues²; A. A. de Oliveira Filho³; E. O. Lima¹

¹ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Castelo Branco III, 58059-900, João Pessoa - PB, Brasil.

² Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Castelo Branco III, 58051-900, João Pessoa - PB, Brasil.

³ Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Jatobá, 58700-970, Patos - PB, Brasil.

*hermes.dn@hotmail.com

(Recebido em 01 de agosto de 2019; aceito em 29 de janeiro de 2020)

A crescente incidência de infecções por bactérias e fungos têm preocupado diversos órgãos de saúde ao redor do mundo. Entre as infecções mais prevalentes estão as bacterianas, causadas por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e infecções fúngicas como candidíase e aspergilose. A farmacoterapia utilizada nos casos de infecção normalmente apresenta toxicidade indesejada e hoje em dia já começa a falhar ao não obter êxito diante de cepas resistentes. Esta realidade gera a necessidade crítica de desenvolvimento de novas estratégias para o combate destas infecções de elevadas taxas de mortalidade. A 3,4-(metilenodióxi)-acetofenona (EPHO) é um produto químico da classe das acetofenonas, facilmente adquirido comercialmente e amplamente utilizado em reações de síntese química. Contudo, ainda não é apropriadamente explorada quanto ao seu potencial antimicrobiano. Para avaliar o perfil antimicrobiano da substância, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada contra cepas bacterianas e fúngicas envolvendo tanto leveduras quanto fungos filamentosos. Foi observado que, apesar do produto se mostrar inerte contra bactérias, ele apresentou atividade inibitória contra algumas cepas de fungos leveduriformes e filamentosos com CIM respectivas de 1024 e 512 µg/mL.

Palavras-chave: Aspergilose, candidíase, microdiluição.

The growing incidence of bacterial and fungal infections have worried several health organizations around the world. Among the most prevalent infections are the bacterial, caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and fungal infections such as candidiasis and aspergillosis. The pharmacotherapy used in these infection cases usually presents undesired toxicity and is currently beginning to fail due to resistant strains. This reality brings the critical need to develop new strategies to combat these infections with high mortality rates. 3,4-(methylenedioxy)-acetophenone (EPHO) is a chemical substance of the class of acetophenones, easily available commercially and widely used in chemical synthesis reactions. However, it is still not properly explored towards its antimicrobial potential. To assess the antimicrobial profile of the substance, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined against bacterial and fungal strains involving both yeast and filamentous fungi. It was observed that, although the product was ineffective against bacteria, it showed inhibitory activity against some strains of yeast and filamentous fungi with respective MICs of 1024 and 512 µg/mL.

Keywords: Aspergilosis, candidiasis, microdilution.

1. INTRODUÇÃO

A nível mundial, o número de infecções bacterianas e fúngicas têm aumentado, trazendo como consequências altas taxas de mortalidade e alto custo associado, representando um grande desafio para os órgãos de saúde pública de diversos países [1].

Mundialmente, as bactérias são responsáveis pela maior parte das infecções humanas, aparecendo também como complicação secundária mais frequente em pacientes hospitalizados. Estas infecções são responsáveis por um vasto número de mortes com crescente aparecimento de cepas multi-resistentes, dentre as quais destacam-se espécies como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* [2-4].



<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200053>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 31, No. 8, 1668-1678, 2020
Printed in Brazil - ©2020 Sociedade Brasileira de Química

Article

New Diesters Derived from Piperine: *in silico* Study and Evaluation of Their Antimicrobial Potential

Emmely O. Trindade,^a Helivaldo D. S. Souza,^a Maria Cláudia R. Brandão,^b
Hermes D. Neto,^c Edeltrudes O. Lima,^c Bruno F. Lira,^a Petrônio F. de Athayde-Filho^a
and José M. Barbosa-Filho^{*c}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

^bInstituto Federal da Paraíba, Campus Areia, 58397-000 Areia-PB, Brazil

^cDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba,
58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

Piperine, previously extracted from black pepper (*Piper nigrum* L.), was used as a precursor for the synthesis of twelve new diester derivatives. The final products were obtained through the bimolecular nucleophilic substitution reaction (S_N2) of the alkyl 2-chloroacetates and the salt of piperic acid, obtained from the basic hydrolysis of piperine. The compounds were synthesized with yields of 55-84% and characterized by infrared spectroscopy and 1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance. The evaluation of the compounds' potential as new drug candidates was done through an *in silico* study of ADME properties (absorption, distribution, metabolism and excretion) and evaluation of antimicrobial activity against bacterial strains (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*), yeasts (*Candida albicans* and *Candida tropicalis*) and filamentous fungi (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*). The *in silico* study showed that the compounds were good drug candidates and antimicrobial evaluation demonstrated that 9 of the 12 compounds exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging 1024-256 $\mu g\ mL^{-1}$.

Keywords: piperine, diesters, antimicrobial activity

Introduction

The number of drug-resistant microorganisms is increasing at alarming rates. The antibiotic resistance crisis has been attributed to the overuse and misuse of these medications, as well as a lack of new drug development by the pharmaceutical industry. When considering the emergence of resistant strains, effective treatment of fungal and bacterial infections has become increasingly challenging for public health systems.^{1,2} Microorganisms such as bacteria and fungi have the genetic ability to acquire and transmit resistance to these drugs.³ Pathogenic agents resist antimicrobial action through mechanisms such as: reduction of the accessibility of the drug to its molecular target, decrease in cellular uptake and increase in drug efflux, resulting in a low and ineffective concentration of the drug, or even mutations that alter their molecular targets, rendering the antibiotic useless.⁴ Besides, toxicity

and therapy costs are other factors that hinder adequate, successful and safe treatment against infectious agents. Accordingly, the research and discovery of new, safe and effective antibiotics is of utmost importance to tackle the growing threat of infections caused by multidrug resistant microorganisms.^{3,5}

Piperine (1-piperoyl-piperidine) is a natural amide with a molecular formula of $C_{17}H_{19}NO_3$. It is a versatile bioactive compound found in almost 2000 species of the genus *Piper*, being also the most abundant alkaloid present in black pepper (*Piper nigrum*) and long pepper (*P. longum*).^{6,7} Piperine alone has a broad spectrum of biological activities such as antiinflammatory, analgesic, anticonvulsant, antimicrobial, antioxidant, antitumor, antidepressant, hepatoprotective, antithyroid and immunomodulatory, among others.^{8,9} Its abundance in plant material, as well as its ease of extraction and possible synthetic manipulations, make piperine a rich source for the discovery of numerous derived molecules with promising biological potential. The literature reports several activities of piperine derivatives,

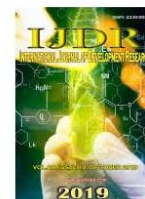
*e-mail: jbarbosa@lbf.ufpb.br



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 09, Issue, 10, pp. 30877-30879, October, 2019

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

ISOEUGENOL EFFICACY AGAINST *Staphylococcus aureus*

¹Lyvia Layanne Silva Rosa, ²José Lucas Ferreira Marques Galvão, ¹Hermes Diniz Neto, ²Jefferson Rodrigues Nóbrega, ¹Daniele de Figueiredo Silva, ²Francisco Patricio de Andrade Júnior, ¹Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo, ¹Shellygton Lima Silva, ^{*1}Laísa Vilar Cordeiro, ³Abrahão Alves de Oliveira Filho and ⁴Edeltrudes de Oliveira Lima

¹PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos²Master's Degree student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos³Professor PhD at Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)⁴Professor PhD at Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

ARTICLE INFO

Article History:

Received 17th July, 2019

Received in revised form

21st August, 2019Accepted 03rd September, 2019Published online 30th October, 2019

Key Words:

Staphylococcus aureus,
Medicinal plants, Gentamicin.

ABSTRACT

Background: *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium responsible for the development of infections of varying degrees of complexity. In addition, due to resistance phenomena, treatment against this pathogen has become increasingly ineffective, making it necessary to search for new molecules with antibacterial activity. **Objective:** The present study aims to evaluate isoeugenol antibacterial activity against clinical strains of *Staphylococcus aureus* through in vitro assays. **Methodology:** It was held Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Time-kill curve and checkerboard association of isoeugenol with standard antibiotic (gentamicin). **Results:** Isoeugenol presented 512 µg/mL MIC, > 4096 µg / mL in the MBC assay and demonstrated non-concentration-dependent bacteriostatic activity. The substance had synergistic and additive results when associated with gentamicin. **Conclusion:** Isoeugenol is an interesting alternative to be better understood, and further studies are needed to better investigate its mechanism of antibacterial action.

Copyright © 2019, Lyvia Layanne Silva Rosa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Lyvia Layanne Silva Rosa, José Lucas Ferreira Marques Galvão, Hermes Diniz Neto, et al. 2019. "Isoeugenol efficacy against *Staphylococcus aureus*", *International Journal of Development Research*, 09, (10), 30877-30879.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is an important human pathogen and causes community and hospital infections. In addition, several resistance phenomena have been associated with this pathogen, making it necessary to search for new drugs with antibacterial activity (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). Among the drug candidates, it is possible to highlight the phenylpropanoid isoeugenol, which has shown antimicrobial activity against several pathogens (HYLDGAARD et al., 2015; ZHANG et al., 2017). However, there are only few studies on the microbicide role of this phytoconstituent against *S. aureus*. Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of isoeugenol against clinical strains of *S. aureus*.

*Corresponding author: Laísa Vilar Cordeiro,

PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

MATERIAL AND METHODS

Cultures: This work investigated the antibacterial activity of isoeugenol against 15 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from different anatomical sites, as reported in Table 1. All strains were isolated and kindly provided by Darci de Magalhães Melo, Pharmacist at the Laboratory of Clinical Pathology "HEMATO", located in João Pessoa-PB/Brazil. The cultures belong to the MICOTECA collection of the "Research Laboratory of Antibacterial and Antifungal Activity of Natural and Synthetic Bioactive Products/ Universidade Federal da Paraíba". As control, one standard strains was used: ATCC-13150. The cultures were maintained at 4°C in Nutrient Agar (NA) (DIFCO Laboratories/ USA /France). For use in the tests, these cultures were reactivated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (DIFCO Laboratories / USA / France) for 24 hours



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRONELAL CONTRA *Candida* NÃO-*albicans* DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA EM PEDIATRIA

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CITRONELLAL AGAINST *Candida* NON-*albicans* OF PEDIATRIC CLINICAL IMPORTANCE



Ana Luísa de Araújo Lima¹; Abrahão Alves de Oliveira Filho²; Ana Luíza Alves de Lima Pérez³; Janiere Pereira de Sousa⁴; Lilian Sousa Pinheiro⁵; Hermes Diniz Neto^{6*}; José Pinto de Siqueira Júnior⁷ e Edeltrudes de Oliveira Lima⁸.

^{1,4,5,6,7,8}Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Castelo Branco III, cep 58059-900, João Pessoa- PB, Brasil.
Fone: (83)3216-7347 - Fax: (83)3216-7094.

²Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Jatobá, cep 58700-970, Patos - PB, Brasil.
Fone: (83)3511-3000.

³Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, Castelo Branco III, cep 58059-900, João Pessoa- PB, Brasil.
Fone: (83)3216-7797.

* Autor correspondente
e-mail: hermes.dn@hotmail.com

Received 17 July 2018; received in revised form 10 August 2018; accepted 13 August 2018

RESUMO

Apesar da sua relação comensal, leveduras de gênero *Candida* podem infectar o ser humano, provocando candidíases que podem variar da forma superficial até a disseminada, ou candidemia. O agente etiológico mais comum destas infecções é *C. albicans*, porém, o perfil destas infecções fúngicas está mudando, onde as espécies não-*albicans* passam a ser os principais patógenos associados a candidíase. A alta taxa de mortalidade associada ao desenvolvimento de resistência contra os antifúngicos padrão são fatores que tornam a candidemia um grave problema de saúde pública mundial, sobretudo em pacientes fragilizados como crianças, especialmente quando existe um agravante como sistema imunológico suprimido. O citronelal, um dos principais fitoconstituintes dos óleos essenciais de diversas plantas, é um potencial candidato a agente antifúngico. Com o objetivo de avaliar o perfil antifúngico deste produto natural, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada contra cepas de *Candida* não-*albicans* provenientes de infecções sanguíneas em pacientes pediátricos. Foi observado que tanto a CIM₅₀ quanto a CFM₅₀ do citronelal foi de 128 µg/mL, atestando a eficácia antifúngica deste monoterpeno contra cepas de relevância clínica.

Palavras-chave: *Candida* não-*albicans*, candidemia, citronelal, monoterpeno, pediatria.

ABSTRACT

Despite their commensal interaction, *Candida* yeasts may infect the human being, causing candidiasis which can vary from a superficial to a disseminated form, namely candidemia. The most common etiological agent of these infections is *C. albicans*; however, the profile of these fungal infections is changing, where non-*albicans* species becomes the main pathogens associated with candidiasis. The high mortality rate associated with the development of resistance against standard antifungal agents are factors that make candidemia a serious public health problem worldwide, especially in fragile patients as children, especially when there is an aggravating as a suppressed immune system. Citronellal, one of the main phytochemicals of the essential oils of several plants, is a potential candidate for an antifungal agent. In order to evaluate the antifungal profile of this natural product, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) were determined against strains of *Candida* non-*albicans* from blood infections in pediatric



Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) contra cepas de *Candida glabrata*

Evaluation of the antifungal activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) against *Candida glabrata*

E. S. Pimenta¹; R. M. C. da Cruz¹; H. Diniz Neto^{2*}; D. F. Silva²; H. M. B. F. de Oliveira³; D. F. Buccini⁴; E. O. Lima²; A. A. de Oliveira Filho⁵

¹Secretaria Municipal de Saúde de Paulo Afonso, Centro, 48603-040, Paulo Afonso - BA, Brasil.

²Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Castelo Branco III, 58059-900, João Pessoa- PB, Brasil.

³Maternidade e Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Praça Manoel Villaga, 59200-000, Santa Cruz - RN, Brasil.

⁴Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Católica Dom Bosco, Jardim Seminário, 79117-900, Campo Grande - MS, Brasil.

⁵Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Jatobá, 58700-970, Patos - PB, Brasil.

*hermes.dn@hotmail.com

(Recebido em 28 agosto de 2018; aceito em 30 de junho de 2019)

A candidíase invasiva é uma ameaça crescente entre pacientes imunocomprometidos, sendo uma causa significativa de morbidade e mortalidade. Epidemiologicamente, as espécies não-*albicans* estão adquirindo relevância por se tornarem os agentes causadores cada vez mais frequentes de candidíase. O uso indiscriminado de medicamentos para combater as diversas variedades de candidíase tem trazido um aumento expressivo no número de leveduras resistentes aos antifúngicos tradicionais. Desta forma, produtos de origem vegetal podem ser utilizados como alternativa para os antifúngicos sintéticos. Com base nestas informações, esta pesquisa objetivou avaliar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) contra cepas de *Candida glabrata* através da técnica de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Após o experimento, observou-se que o produto inibiu a cepa LM-302 de *C. glabrata* com uma CIM de 256 µg/mL. O mesmo valor foi obtido para a CFM contra esta mesma cepa. Portanto, pode-se concluir que o óleo essencial de *P. cablin* testado apresenta um efeito antifúngico contra as leveduras de *C. glabrata*.

Palavras-chave: *Candida non-albicans*, fitoterapia, *Pogostemon cablin*.

Invasive candidiasis is a growing threat among critically ill patients and is a significant cause of morbidity and mortality. Epidemiologically, non-*albicans* species are becoming relevant because they are becoming the most frequent causative agents of candidiasis. The indiscriminate use of drugs to combat the various strains of candidiasis has brought an expressive increase in the number of drug resistant yeasts. In this way, products of plant origin can be used as a substitute for synthetic antifungals agents. Based on this information, this research aimed to evaluate the possible antifungal activity of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) essential oil against *Candida glabrata* strains by microdilution technique for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). After the experiment, the product was found to inhibit the *C. glabrata* strain LM-302 with a MIC of 256 µg/ml. The same value was obtained for MFC against this same strain. Therefore, it can be concluded that the essential oil of *P. cablin* tested has an antifungal effect against the yeasts of *C. glabrata*.

Keywords: *Candida non-albicans*, phytotherapy, *Pogostemon cablin*.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 80% das infecções fúngicas sistêmicas, representando 17% dos casos de infecções em unidades de terapia intensiva. Além de possuir

Activity anti-*Candida albicans* and Effects of the Association of β -citronellol with Three Antifungal Azoles

Daniele F. SILVA*, Ana C.L. SILVA, Hermes DINIZ-NETO,
Heloísa M.B.F. OLIVEIRA, Cássio I.S. MEDEIROS, Júlio A. PEREIRA,
Janiere P. SOUSA, Abrahão A. OLIVEIRA-FILHO & Edeltrudes O. LIMA

Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil,² University Hospital Ana Bezerra,
Federal University of Rio Grande of Norte, Santa Cruz, Rio Grande of Norte, Brazil.

SUMMARY. *Candida albicans* is the main yeast agent provider opportunistic fungal infections in healthy and immunocompromised humans. This work evaluated the antifungal potential of the monoterpene β -citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) against twelve *C. albicans* strains as well as the effects of its association with three azoles. β -citronellol showed a MIC_{50%} of 128 μ g/mL being established as strong antifungal activity and MFC_{50%} of 256 μ g/mL. High resistance rate against itraconazole (91.67%) and fluconazole (75%) was exhibited by the yeasts while it was sensitive to miconazole (66.67% of the yeasts showed growth inhibition). Synergism was prevailing on the association tests with all three azoles (66.67% for both fluconazole and itraconazole and 83.33% for miconazole). Association with the monoterpene also decreased the yeast's resistance against the azoles. β -citronellol showed activity against *C. albicans* strains, displaying optimum fungicidal potential and good interfering effect, which allows it to be considered a candidate for the development of new antifungal formulations.

RESUMEN. *Candida albicans* es la principal levadura que proporciona infecciones fúngicas oportunistas en humanos sanos e inmunocomprometidos. Este trabajo evaluó el potencial antifúngico del monoterpene β -citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) contra doce cepas de *C. albicans*, así como los efectos de su asociación con tres azoles. El β -citronelol mostró una MIC_{50%} de 128 μ g/mL que se estableció como una fuerte actividad antifúngica y MFC_{50%} de 256 μ g/mL. Las levaduras exhibieron una alta tasa de resistencia contra itraconazol (91,67%) y fluconazol, (75%) mientras que eran sensibles a miconazol (66,67% de las levaduras mostraron inhibición del crecimiento). La sinergia prevaleció en las pruebas de asociación con los tres azoles (66,67% para fluconazol e itraconazol y 83,33% para miconazol). La asociación con el monoterpene también disminuyó la resistencia de la levadura contra los azoles. β -citronelol mostró actividad contra las cepas de *C. albicans*, demostrando un potencial fungicida óptimo y un buen efecto de interferencia, lo que permite que se lo considere un candidato para el desarrollo de nuevas formulaciones antifúngicas.

KEY WORDS: anti-*C. albicans*, association, β -citronellol.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: danielieferredo31@gmail.com

Antifungal Activity of *Cymbopogon winterianus* (citronella) Essential Oil on *Candida albicans* isolates of Pediatric Clinical Importance

Ana L. A. LIMA¹, Ana L. A. L. PÉREZ², Janiere P. SOUSA¹, Lilian S. PINHEIRO¹,
Hermes DINIZ-NETO^{1*}, Daniele F. SILVA¹, Abrahão A. OLIVEIRA-FILHO³,
Edeltrudes O. LIMA¹, & José P. S. JÚNIOR¹

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde.
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal da Paraíba (PB), Brasil.

³ Unidade acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural,
Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

SUMMARY. Candidemia is an important problem in pediatrics, especially because of the high mortality rates in immunocompromised and hospitalized children. The essential oil of *Cymbopogon winterianus* possess a wide range of pharmacological properties, including antimicrobial activity. In order to assess the antifungal activity of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) against isolates of *Candida albicans* of clinical relevance in pediatrics, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined through broth microdilution technique. In this work, the possible mechanism of action exerted by the essential oil against the microbial cell wall and plasmatic membrane was also evaluated through the sorbitol and ergosterol assays. The natural product displayed a MIC of 128 µg/mL against 80% of the isolates and a MFC of 256 µg/mL against 90% of the strains. No involvement with the cell wall nor binding to ergosterol was observed.

RESUMEN. La candidemia es un problema importante en pediatría, especialmente debido a las altas tasas de mortalidad en niños inmunocomprometidos y hospitalizados. El aceite esencial de *Cymbopogon winterianus* posee una amplia gama de propiedades farmacológicas, incluida la actividad antimicrobiana. Con el objetivo de evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) frente a aislados de *Candida albicans* de importancia clínica en pediatría, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración fungicida mínima (MFC) mediante microdilución en caldo. En este trabajo, el posible mecanismo de acción ejercido por el aceite esencial contra la pared celular microbiana y la membrana plasmática también se evaluó a través de los ensayos de sorbitol y ergosterol. El producto natural mostró una MIC de 128 µg/mL frente al 80% de los aislados y un MFC de 256 µg/mL frente al 90% de los aislados.

KEY WORDS: antifungal activity, *Candida albicans*, candidemia, *Cymbopogon winterianus*, essential oil, pediatrics.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: hermes.dn@hotmail.com

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL CONTRA *CANDIDA* NÃO-*ALBICANS* DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA EM PEDIATRIA**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF GERANIOL AGAINST *CANDIDA* NON-*ALBICANS* OF CLINICAL IMPORTANCE IN PEDIATRICS**

ANA LUÍSA DE ARAÚJO **LIMA**. Doutora, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

ABRAHÃO ALVES DE **OLIVEIRA FILHO**. Doutor. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos - PB, Brasil.

ANA LUÍZA ALVES DE LIMA **PÉREZ**. Doutora, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

JANIERE PEREIRA DE **SOUSA**. Doutora, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

LILIAN SOUSA **PINHEIRO**. Doutora, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos - PB, Brasil.

HERMES **DINIZ NETO**. Mestre, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

JOSÉ PINTO DE **SIQUEIRA JÚNIOR**. Doutor. Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

EDELTRUDES DE OLIVEIRA **LIMA**. Doutora, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

Castelo Branco III, CEP: 58059-900, João Pessoa-PB, Brasil. E-mail: hermes.dn@hotmail.com

RESUMO

Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento nos casos de infecções hospitalares provocadas por leveduras do gênero *Candida*, com notável crescimento da ocorrência de espécies não-*albicans*, com o agravante de que estas espécies normalmente apresentam resistência aos antifúngicos tradicionais. Na população pediátrica, este fato se torna uma grande preocupação devido as altas taxas de mortalidade. Já foi demonstrado que o monoterpeno geraniol possui diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antifúngica. Diante destas premissas, foi avaliada a atividade antifúngica do geraniol, contra cepas de *Candida* não-*albicans* clinicamente importantes na pediatria. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas pelas técnicas de microdiluição em caldo. A CIM₅₀ do fitoconstituente foi estabelecida como 32 µg/mL, enquanto a CFM₅₀ para os isolados testados foi de 64 µg/mL. Diante dos resultados pode-se observar o valor antifúngico do geraniol contra cepas de *Candida* não-*albicans* clinicamente relevantes para a pediatria médica.

EDUCAÇÃO AMBIENTAL EM SAÚDE: ESTUDO DOS CASOS DE LEPTOSPIROSE NOTIFICADOS NA PARAÍBA (2015 A 2017)

Ana Carla da Silva Rodrigues¹; Hermes Diniz Neto²; Raquel Vieira Bezerra³; Heloísa Mara Batista Fernandes Oliveira⁴; Raline Mendonça dos Anjos⁵; Abrahão Alves de Oliveira Filho^{6*}

¹Aluna de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande. e-mail: anacarlarodrigues18@hotmail.com.

²Aluno de Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba e-mail: hermes.dn@hotmail.com.

³Aluna de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande. e-mail: raquelvieir62@gmail.com.

⁴Doutora em Farmacologia, Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. e-mail: heloisambf@gmail.com.

⁵Doutora em Farmacologia, Universidade Federal de Campina Grande. e-mail: raline.anjos@gmail.com.

⁶Doutor em Farmacologia, Universidade Federal de Campina Grande. e-mail: abrahao.farm@gmail.com.

Resumo: Leptospirose é uma doença infecciosa com maior incidência nas regiões tropicais sendo frequente em países subdesenvolvidos. O objetivo deste estudo foi executar uma análise dos casos referentes a leptospirose notificados no estado da Paraíba no período de 2015 a 2017. Realizou-se um estudo descritivo, quantitativo, retrospectivo epidemiológico dos casos relativos a leptospirose notificados no estado da Paraíba de 2015 a 2017 com dados provenientes do Sistema de Informação de Agravos Notificados (SINAN). Foi possível verificar um total de 1162 casos de leptospirose para a região nordeste durante o período estudado, a Paraíba ocupou a sétima posição apresentando 28 (2,4%) casos confirmados. Houve predominância de registros confirmados para o gênero masculino (82%), idade entre 20 e 39 anos (50%), proveniente da zona urbana (89%). Sendo notável grande deficiência quanto ao preenchimento das fichas para a variável escolaridade com destaque para o item ignorado ou branco (46,42%). O método diagnóstico clínico-laboratorial demonstrou maior acurácia (82%). Das pessoas infectadas, 82% obtiveram a cura e 11% foram a óbito. Desta maneira, a leptospirose continua sendo uma doença bastante presente em toda a região Nordeste, salientando assim a relevância da educação ambiental em saúde e da melhoria das condições sanitárias locais.


ESTUDO *IN SILICO* DO PERFIL ANTIMICROBIANO DO β -CITRONELOL: POTENCIALIDADE COMO ANTIFÚNGICO
***IN SILICO* STUDY OF THE ANTIMICROBIAL PROFILE OF β -CITRONELLOL: POTENTIAL AS AN ANTIFUNGAL**

 SILVA, Daniele de Figueredo¹; NETO, Hermes Diniz^{2*}; FERREIRA, Maria Denise Leite³; FILHO, Abrahão Alves de Oliveira⁴; LIMA, Edeltrudes de Oliveira⁵.

^{1,2,3,5} Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde

⁴ Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande

 * Autor correspondente
 e-mail: hermes.dn@hotmail.com

Received 30 April 2019; received in revised form 19 July 2019; accepted 20 July 2019

RESUMO

O β -citronelol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) vem exibindo uma série de efeitos farmacológicos que despertam o interesse a cerca de seu potencial antimicrobiano, uma vez que várias substâncias da classe dos monoterpenos também já demonstraram possuir atividade neste perfil. Além disso, a emergência de espécies fúngicas resistentes à farmacoterapia atual representa um grave desafio aos sistemas de saúde, tornando necessária a busca de novas alternativas terapêuticas eficazes para lidar com este problema. Neste estudo, buscou-se realizar a análise do perfil antimicrobiano do β -citronelol. O software Prediction of Activity Spectra for Substances ou (PASS) *online* foi utilizado para estudar a atividade antimicrobiana da molécula do β -citronelol por emprego da análise *in silico*. Em contrapartida, foi realizado um estudo antifúngico *in vitro* desse monoterpeno. Para isso, foi determinado sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela a realização da técnica de microdiluição em placas de 96 cavidades em Caldo Saboraud Dextrose/RPMI frente a cepas sensíveis de *Candida albicans*, sendo esse ensaio realizado em duplicata. Na análise *in silico* do perfil antimicrobiano, foi revelado que o monoterpeno β -citronelol apresentou ter um perfil de bioatividade antimicrobiana diversa. Para a atividade antifúngica apresentou um valor percentual com Pa: 58,4% (predominante) e sua CIM de 128 μ g/mL que foi equivalente para todas as cepas testadas. O estudo *in silico* da molécula do β -citronelol permitiu considerar que o monoterpenoide apresenta ter maior probabilidade em ser bioativo contra agentes provocadores de infecções fúngicas.

Palavras-chave: β -citronelol, *Candida albicans*, perfil antimicrobiano, *in silico*.

ABSTRACT

β -citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) has been exhibiting a number of pharmacological effects that creates interest about its antimicrobial potential, since several substances of the monoterpene class have already demonstrated to possess activity in this profile. In addition, the emergence of fungal species resistant to current pharmacotherapy poses a serious challenge to health systems, making it necessary to search for new effective therapeutic alternatives to deal with this problem. In this study, the antimicrobial profile of β -citronellol was analyzed. The Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) online software was used to study the antimicrobial activity of the β -citronellol molecule by the use of *in silico* analysis. In contrast, an *in vitro* antifungal study of this monoterpene was carried out. For this purpose, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the microdilution technique in 96-well plates in Saboraud Dextrose Broth/RPMI against sensitive strains of *Candida albicans*, and this assay was performed in duplicate. In the *in silico* analysis of the antimicrobial profile, it was revealed that the monoterpene β -citronellol had a diverse antimicrobial bioactivity profile. For the antifungal activity, it presented a percentage value with Pa: 58.4% (predominant) and its MIC of 128 μ g/mL, which was equivalent for all strains tested. The *in silico* study of the β -citronellol molecule allowed us to consider that the monoterpenoid is very likely to be bioactive against agents that cause fungal infections.

Keywords: β -citronellol, *Candida albicans*, antimicrobial profile, *in silico*.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO *p*-cimeno FRENTE AS CEPAS DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii*

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO *p*-cimeno FRENTE AS CEPAS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii*

Ana Luiza de Oliveira Lopes¹

Hermes Diniz Neto²

Maria das Neves Silva Neta³

Edeltrudes de Oliveira Lima⁴

Felipe Queiroga Sarmiento Guerra^{4,5}

^{1,3}Mestrandas no Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos (PPgPNSB/UFPB); ² Doutorando do PPgPNSB/UFPB; ⁴ Professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB; ⁵ Orientador.
ana.lopes0407@gmail.com

RESUMO: A esporotricose é uma das infecções fúngicas subcutâneas que mais acomete humanos e animais, é causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*. A doença possui distribuição mundial, entretanto sua prevalência exata é desconhecida, pelo fato de ser pouco notificada. No Brasil, o estado com maior incidência é o Rio de Janeiro, onde a esporotricose já se tornou uma epidemia e cepas resistentes aos antifúngicos convencionais são encontradas. Nesse contexto, é de grande relevância a pesquisa de novas moléculas farmacologicamente ativas para essa infecção. Os óleos essenciais são conhecidos por apresentarem atividade antifúngica, e o *p*-cimeno é um fitoconstituente presente na composição de diversos óleos com atividade anti-*Sporothrix* comprovada. Diante disso, este trabalho objetivou investigar a menor concentração do *p*-cimeno capaz de inibir o crescimento das cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (CIM), bem como a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) para determinar se o fitoconstituente é um agente fungicida ou fungistático. Os resultados obtidos mostraram que a CIM do *p*-

CAPÍTULO 4



ASPECTOS CLÍNICOS E FARMACOLÓGICOS DAS CANDIDÍASES

Daniele de Figuerêdo Silva¹, Hermes Diniz Neto¹, Cássio Ilan Soares Medeiros¹,
Shellygton Lima Silva¹, Laísa Vilar Cordeiro¹, Edeltrudes de Oliveira Lima¹

1. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

RESUMO

O gênero *Candida* é responsável pela maior parte das infecções fúngicas humanas, possuindo ampla distribuição mundial. Dentro deste gênero, são consideradas as principais espécies patogênicas ao homem *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. auris*. As candidíases apresentam-se em diferentes formas clínicas, classificando-se principalmente como bucal, otológica, ungueal, vaginal, invasiva e ocular. Tais enfermidades são comumente negligenciadas pelos sistemas de saúde e o tratamento antifúngico disponível atualmente restringe-se a poucas opções de fármacos, com consideráveis efeitos adversos e, ademais, tem-se relatado um crescente índice de microrganismos resistentes. Algumas perspectivas para novos tratamentos são apontadas e, nesse contexto, é fundamental o desenvolvimento destas novas abordagens, bem como de pesquisas que visem o esclarecimento dos aspectos moleculares envolvidos em tais infecções fúngicas.

Palavras-chave: *Candida*, Candidíase e Antifúngicos.

ABSTRACT

The genus *Candida* is responsible for most human fungal infections, having a wide worldwide distribution. Within this genus, the main species pathogenic to humans are *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. auris*. Candidiasis come in different clinical forms, mainly classified as oral, otological, nail, vaginal, invasive and ocular. Such diseases are commonly neglected by health systems and the antifungal treatment currently available is restricted to a few drug options, with considerable adverse effects and, in addition, an increasing rate of resistant microorganisms has been reported. Some perspectives for new treatments are pointed out and, in this context, it is essential to develop these new approaches, as well as research aimed at clarifying the molecular aspects involved in such fungal infections.

Keywords: *Candida*, Candidiasis and Antifungals.



We certify that **Catarina Alves de Lima Serafim** received **Honorable Mention** for the poster **PT 9.034: "EVALUATION OF ACUTE TOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF α -ASARONE IN EXPERIMENTAL MODELS"** by Serafim CAL, Pessoa MLS, Alves Júnior EB, Formiga RO, Diniz Neto H, Lima EO, Batista LM, at the **50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE)**, held in **Ribeirão Preto, SP, Brazil**, from **September 25-28, 2019**.


 André S. Pupo
 Congress President



Centro de Convenções
de Ribeirão Preto, SP

September
25-28
2018



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado **SÍNTESE DA α -CLORO-N-(4-METÓXIFENIL)ACETAMIDA E SUA POTENCIALIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*** de autoria de **Verônica L. Santos, Francinara S. Alves, Abraão P. de Sousa, Rafael F. Oliveira, Helivaldo D. S. Souza, Laisa V. Cordeiro, Normando A. S. Costa, Hermes D. Neto, Edeltrudes O. Lima e Petrônio F. A. Filho**, foi apresentado no I Simpósio de Química do CCA/UFPB, realizado no período de 20 a 22 de novembro de 2018, no Campus II da Universidade Federal da Paraíba em Areia-PB, contabilizando carga horária total de 30 horas.

Areia, 22 de novembro de 2018.



Prof. Dr. Sidney Ramos de Santana
Coordenador da Comissão Organizadora



I SIMPÓSIO DE QUÍMICA CCA/UFPB



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado **Síntese das selenoglicolicamidas e sua potencialidade antifúngica contra cepas de *Candida*** de autoria de **Francinara S. Alves, Helivaldo D. S. Souza, Verônica L. Santos, Priscila S. V. Lima, Abraão P de Sousa, Normando A. S Costa, Laia V. Cordeiro, Hermes D. Neto, Edeltrudes O. Lima e Petrônio F. A. Filho**, foi apresentado na modalidade Comunicação Oral no I Simpósio de Química do CCA/UFPB, realizado no período de 20 a 22 de novembro de 2018, no Campus II da Universidade Federal da Paraíba em Areia-PB, contabilizando carga horária total de 30 horas.

Areia, 22 de novembro de 2018.

Sidney Ramos de Santana

Prof. Dr. Sidney Ramos de Santana
Coordenador da Comissão Organizadora



VI SEMANA DE
BIOCIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE
FIOCRUZ PERNAMBUCO, CAMPUS UFPE

CERTIFICADO

A Fiocruz Pernambuco certifica que o trabalho científico intitulado:
Avaliação da atividade antifúngica do p-cimeno frente cepas de *Sporothrix* spp

com os autores:

ALAN, F. SILVA; ANA, L. O. LOPES; NATÁLIA, D. N. PAZOS; FELIPE, Q. S. GUERRA; HERMES, D. NETO; EDELTRUDES, O. LIMA; ZÉLIA, B. V. S. PONTES.

foi apresentado na forma de pôster durante a VI Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde, realizado no período de 22 a 26 de outubro de 2018.

Recife, 26 de outubro de 2018

Ana Paula Nascimento
Dra. Ana Paula Nascimento
Vice-diretora de Ensino e Informação
Científica Fiocruz PE

Sheilla Andrade de Oliveira
Dra. Sheilla Andrade
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em BBS Fiocruz PE

Gabriel Faierstein
MSc. Gabriel Faierstein
Coordenador da VI Semana de
Biociências e Biotecnologia em Saúde

Apoio:



Realização:

