



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS
LABORATÓRIO DE PESQUISAS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIFÚNGICA

ALBERTO SHELLYGTON LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE 2-CLORO-N-FENILACETAMIDA (A1C1)
CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* DE ORIGEM CLÍNICA

João Pessoa-PB

2023

ALBERTO SHELLYGTON LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE 2-CLORO-N-FENILACETAMIDA (A1CI)
CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* DE ORIGEM CLÍNICA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento às exigências
para obtenção do título de Doutor em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de
concentração: FARMACOLOGIA.**

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa-PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Alberto Shellygton.

Avaliação da atividade antifúngica de 2-Cloro
N-fenilacetamida contra espécies de candida de origem
clínica / Alberto Shellygton Lima. - João Pessoa, 2023.
124 f. : il.

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

1. Fungicida - Candida. 2. 2-Cloro-N-Fenilacetamida.
3. Antibiofilme. 4. Docking molecular. 5. Dinâmica
molecular. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.282.84(043)

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE 2-CLORO-N-FENILACETAMIDA (A1C1)
CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* DE ORIGEM CLÍNICA**

Aprovado: 03 de março de 2023

BANCA EXAMINADORA




Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Orientadora - PgPNSB/UFPB)

Prof. Dr. Itácio Queiroz de Mello Padilha
(Membro Suplente)



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(Membro Titular - PPgCSA/UFCG)

Profa. Dra. Márcia regina Piuvezam
(Membro Suplente - PgPNSB/UFPB)



Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros
(Membro Titular - UFCG)



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
(Membro Titular - PgPNSB/UFPB)



Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra
(Membro Titular - PgPNSB/UFPB)

Dedico esse trabalho a minha mãe Maria Do Carmo, aos meus irmãos e familiares, pessoas que não mediram esforços e apoios em todas as batalhas de minha vida. Em especial, dedico esse trabalho ao pequeno Lucas Vinícius, meu maior e melhor amigo, pois muito do tempo destinado a essa pesquisa era por direito seu.

Agradecimientos

Agradeço a Deus, meu refúgio e minha fortaleza, pelo dom supremo da vida e por sua imensurável proteção e fidelidade, algo que excede todo entendimento.

A minha mãe Maria do Carmo, exemplo de determinação, força, honestidade, dedicação, preocupação excessiva e formação moral. Sou eternamente grato por tudo que hoje sou; dado que foram os teus ensinamentos que me levaram em direção aos êxitos e conquistas pessoais e profissionais realizadas. Essa conquista não é só minha, e sim nossa!.

Ao “ferinha” Lucas Vinicius, criança iluminada, que só veio agraciar minha existência, e que apesar de sua pouca idade muito compreendeu minha ausência. Um exemplo de serenidade, minha fonte de ânimo, inspiração e de coragem, aquele que me fez superar todos os desafios, meu maior encorajador.

Aos meus irmãos, Lucas Patchelly e Ionara Lima que em momentos de minha ausência, com muita compreensão e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa. Cada um, a seu modo, sempre se honram de mim, com muito apoio e resiliência nos momentos de minha ausência, sempre acreditando em minha caminhada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e sabedoria com que transmitiu os todos os conhecimentos aos longo dos anos, conduzindo um modesto discente a atingir suas metas de forma digna e honesta. Exemplo de ética, seriedade e profissionalismo.

Aos Professores Dr. Fillipe Pereira de Oliveira, Dra. Girliane Regina da Silva e Msc. Rodrigo Luiz Targino Dutra pelos ensinamentos, paciência, por acreditarem em meu potencial, por abrirem às portas da docência, onde pude vivenciar experiências gratificantes para minha vida acadêmica e profissional.

Aos membros do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica. Obrigado pelo apoio incondicional!

Aos excelentes professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelas inúmeras contribuições em minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Marcus Tulio Scotti pela colaboração em realizar os estudos computacionais (docking e dinâmica molecular) do trabalho em questão. A Dra. Mayara Maia do laboratório de quimioinformática por toda ajuda, apoio e paciência nas análises computacionais.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e o apoio técnico de Caroline

Mangueira e Nilmar Nícia pela ajuda concedida sempre-que necessário.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta em minha formação pessoal e profissional, que neste momento, eu possa ter deixado de mencionar.

Meus sinceros agradecimentos!

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente”.

Autor desconhecido

LIMA, A. S. Avaliação da atividade antifúngica de 2-Cloro-*N*-Fenilacetamida (A1Cl) contra espécies de *Candida* de origem clínica. 2023. 124p. Tese (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023.

RESUMO

Candida e micoses são uma preocupação crescente de saúde pública global. *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* estão na lista de patógenos fúngicos prioritários criada pela Organização mundial de saúde. Assim, é planejado o desenvolvimento de pesquisas para geração de novos fármacos com intuito de combater e prevenir o desenvolvimento de resistência. Neste sentido, estudos de prospecção com intermediários de reações com grupamentos de amidas e átomos de cloro são uma estratégia promissora. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica da molécula sintética 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas (A1Cl), frente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por microdiluição, de modo que os valores variaram de 16 a 256 µg/mL para A1Cl e 8 a 512 µg/mL para fluconazol (controle positivo). A concentração fungicida mínima foi semelhante a CIM, para ambos os compostos avaliados, confirmando efeito fungicida de A1Cl. No modelo de alterações morfológicas (técnica de microcultivo), A1Cl e fluconazol reduziu a formação de estruturas de virulência comparados aos seus respectivos controles, evidenciando um efeito dependente de concentração. A presença de sorbitol e ergosterol exógeno não alterou os valores de CIM, confirmando que A1Cl não exerce efeito interferindo na funcionalidade e/ou integridade da parede e membrana celular, respectivamente. O estudo de associação (*checkerboard*) de A1Cl com fluconazol resultou em efeito antifúngico de indiferença. No ensaio de efeito antibiofilme *in vitro* A1Cl foi capaz de inibir a formação de biofilme em mais de 45% e 80% (**p<0,001), e capaz de promover ruptura de biofilme pré-formado em mais de 35% e 60% (**p<0,001), em concentrações sub e suprainibitórias, respectivamente, quando comparados aos respectivos grupos controle. Todavia, para fluconazol alcançar 50% (**p<0,001) ou mais de efeito de inibição foi necessário concentrações suprainibitórias. De forma semelhante, A1Cl (CIM) foi capaz de inibir em mais de 50% (**p<0,001) a formação de biofilmes em modelo *ex vivo* (fragmentos de unhas) e para o fluconazol alcançar o mesmo efeito antibiofilme em mais de 50% foi necessário 4xCIM. A1Cl apresentou valores de energia de ligação maiores ou próximos ao fluconazol em pelo menos uma função de pontuação, para Dihidrofolato redutase (DHFR), Geranilgeraniltransferase-I (GGTase-I) e Protease aspártica-2 (SAP-2), de modo que essas enzimas, podem ser alvos susceptíveis à ação antifúngica de A1Cl. O RMSD dos complexos avaliados revelou estabilidade em torno de 2-3ns e manteve sua estabilidade acima de 10 ns. Para o RMSF dos complexos, observamos interações semelhantes às pesquisadas no docking após simulações dinâmicas em tempos de 200 e 600ps e que A1Cl permaneceu no sítio ativo sob a influência de solventes e flexibilidade estrutural. Diante desses resultados é possível inferir que A1Cl apresenta efeito antifúngico e que essa atividade está relacionada com mecanismos antibiofilmes e ligação à DHFR e SAP-2.

Palavras-chave: 2-Cloro-*N*-Fenilacetamida; *Candida*, antibiofilmes, docking molecular e dinâmica molecular.

SILVA, S. L. Evaluation of the antifungal activity of 2-Chloro-N-Phenylacetamide (A1Cl) against candida species of clinical origin. 2023. 124p. Thesis (Post-Graduation in Natural and Synthetic Bioactive Products - Pharmacology). Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2023.

ABSTRACT

Candida and mycoses are a growing global public health concern. *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* are on the list of priority fungal pathogens created by the World Health Organization. Thus, the development of research is planned to generate new drugs in order to combat and prevent the development of resistance. In this sense, prospective studies with reaction intermediates with amide groups and chlorine atoms are a promising strategy. This work aimed to evaluate the antifungal activity of the synthetic molecule 2-Chloro- N-phenylacetamides (A1Cl) against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by microdilution, so that values ranged from 16 to 256 µg/mL for A1Cl and 8 to 512 µg/mL for fluconazole (positive control). The minimum fungicidal concentration was similar to the MIC, for both evaluated compounds, confirming the fungicidal effect of A1Cl. In the model of morphological changes (microculture technique), A1Cl and fluconazole reduced the formation of virulence structures compared to their respective controls, showing a concentration-dependent effect. The presence of sorbitol and exogenous ergosterol did not alter the MIC values, confirming that A1Cl has no effect interfering with the functionality and/or integrity of the cell wall and membrane, respectively. The association study (*checkerboard*) of A1Cl with fluconazole resulted in an antifungal effect of indifference. In the in vitro antibiofilm effect assay, A1Cl was able to inhibit biofilm formation by more than 45% and 80% (***p<0.001), and was able to promote preformed biofilm rupture by more than 35% and 60 % (***p<0.001), in sub and supra inhibitory concentrations, respectively, when compared to the respective control groups. However, for fluconazole to achieve 50% (***p<0.001) or more inhibition effect, supra-inhibitory concentrations were required. Similarly, A1Cl (CIM) was able to inhibit by more than 50% (***p<0.001) the formation of ex vivo biofilms (nail fragments) and for fluconazole to achieve the same antibiofilm effect by more than 50% 4x CIM was required. A1Cl showed binding energy values greater than or close to fluconazole in at least one scoring function, for Dihydrofolate reductase (DHFR), Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) and Aspartic Protease-2 (SAP-2), so that these enzymes, may be targets susceptible to the antifungal action of A1Cl. The RMSD of the evaluated complexes revealed stability around 2-3ns and maintained its stability above 10 ns. For the RMSF of the complexes, we observed interactions similar to those investigated in docking after dynamic simulations at times of 200 and 600ps and that A1Cl remained in the active site under the influence of solvents and structural flexibility. Given these results, it is possible to infer that A1Cl has an antifungal effect and that this activity is related to antibiofilm mechanisms and binding to DHFR and SAP-2.

Keywords: 2-Chloro-N-Phenylacetamide; *Candida*, antibiofilms, molecular docking and molecular dynamic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características de Macro e micromorfologia de <i>Candida albicans</i>	27
Figura 2: Principais vias de sinalização celular de regulação de morfogênese em espécies de <i>Candida</i>	28
Figura 3: Onicomicose subungueal distal e lateral.....	30
Figura 4: Onicomicose distal e lateral.....	31
Figura 5: Onicomicose superficial subungueal proximal.....	31
Figura 6: Onicomicose Endonix.....	32
Figura 7: Onicomicose em distrofia total.....	32
Figura 8: Mecanismos de formação de biofilmes fúngicos.....	36
Figura 9: Principais mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos.....	41
Figura 10: Estrutura química de 2-Cloro- <i>N</i> -Fenilacetamida.....	44
Figura 11: Análise de micromorfologia de <i>Candida albicans</i> ATCC-76645 (A), LM-441 (B) e LM-600 (C) ausência (I) presença de A1Cl (II) e presença de fluconazol (III).....	69
Figura 12: Análise de micromorfologia de <i>Candida tropicalis</i> ATTC-13803 (A), LM-98 (B) e LM-111 (C) na ausência (I) presença de A1Cl (II) e presença de fluconazol (III).....	70
Figura 13: Análise de micromorfologia de <i>Candida parapsilosis</i> ATTC-22019 (A), LM-78 (B) e LM-197 (C) na ausência (I) e presença de A1Cl (II) e presença de fluconazol (III).....	71
Figura 14: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre a formação do biofilme <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> ATTC-76645 (A), LM - 441 (B) e LM-600 (C).....	81

Figura 15: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre a formação do biofilme <i>in vitro</i> de <i>Candida tropicalis</i> ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM-111 (C).....	82
Figura 16: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre a formação do biofilme <i>in vitro</i> de <i>Candida parapsilosis</i> ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-197 (C).....	84
Figura 17: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre biofilme pré-formado (ruptura) <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> ATTC-76645 (A), LM - 441 (B) e LM-600 (C).....	85
Figura 18: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre biofilme pré-formado (ruptura) <i>in vitro</i> de <i>Candida tropicalis</i> ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM-111 (C).....	86
Figura 19: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre biofilme pré-formado (ruptura) <i>in vitro</i> de <i>Candida parapsilosis</i> ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-197 (C).....	87
Figura 20: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre células planctônicas em fragmentos de unhas (<i>ex vivo</i>) frente <i>Candida albicans</i> ATTC-76645 (A), LM - 441 (B) e LM-600 (C).....	91
Figura 21: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre células planctônicas em fragmentos de unhas (<i>ex vivo</i>) frente <i>Candida tropicalis</i> ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM - 111 (C).....	92
Figura 22: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre células planctônicas em fragmentos de unhas (<i>ex vivo</i>) frente <i>Candida parapsilosis</i> ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-197 (C).....	93
Figura 23: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre ruptura de biofilmes pré-formados em fragmentos de unhas (<i>ex vivo</i>) frente <i>Candida albicans</i> ATTC-76645 (A), LM-441 (B) e LM-600 (C).....	94
Figura 24: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre ruptura de biofilmes pré-formados em fragmentos de unhas (<i>ex vivo</i>) frente <i>Candida tropicalis</i> ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM-111 (C).....	95
Figura 25: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre ruptura de biofilmes pré-formados em fragmentos de unhas (<i>ex vivo</i>) frente <i>Candida parapsilosis</i> ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-	

197 (C).....	96
--------------	----

Figura 26: Interação molecular entre A1Cl e resíduos de aminoácidos dos sítios ativos de Dihidrofolato redutase (A), Geranilgeraniltransferase-I (B) e Protease aspártica-2 (C).....100

Figura 27: Desvio da raiz quadrático médio dos átomos de C α dos compostos A1Cl, ligante PDB e fluconazol com DHFR (A), GGTase-I (B) e SAP-2 (C)..... 101

Figura 28. Desvio da raiz quadrático de flutuações dos átomos de C α dos compostos A1Cl, ligante PDB e fluconazol com DHFR (A), GGTase-I (B) e SAP-2 (C)..... 103

Figura 29: Simulações de dinâmica molecular do complexo DHFR-A1Cl, GGTase-A1Cl e SAP-2-A1Cl (A) em 200 ps (b) e 600 ps (c), respectivamente..... 104

Figura 30: Descrição de alvos moleculares de A1Cl para mecanismos antibiofilmes..... 107

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resultados dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de A1Cl e fluconazol contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.....60
- Tabela 2:** Resultado de alterações m i c r o m o r f o l ó g i c a s de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na presença de A1Cl e fluconazol.....67
- Tabela 3:** Efeito de A1Cl e caspofungina contra *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* na ausência e presença de sorbitol 0,8mol/L 73
- Tabela 4:** Efeito de A1Cl e anfotericina B contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na ausência e presença de ergosterol 400 µg/mL..... 76
- Tabela 5:** Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre A1C com fluconazol sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* - Método *Checkerboard*..... 78
- Tabela 6:** Energias de ligação (pontuação de Moldock e Rerank) de A1Cl, fluconazol e ligantes de banco de dados de proteínas em alvos moleculares..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A1Cl 2-Cloro *N*-Fenilacetamida

ASD Ágar Sabouraud extrose

ATCC American Type Culture Collection

CCS Centro de Ciências da Saúde

CFM Concentração Fungicida mínima

CIM Concentração inibitória mínima

DHFR Dihidrofolato reductase

GGTase -I Geranylgeranyl Transferase-I

KOH Hidróxido de potássio

LM Laboratório de Micologia

RMSD Desvio Médio da raiz quadrático

RMSF Raiz Quadrada Média de Flutuação

SAP-2 Protease aspártica-2

UFC/mL Unidades formadoras de colônias por mililitro

UFPB Universidade Federal da Paraíba

Obs: As abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Aspectos gerais dos fungos.....	25
1.2 Fungos do gênero <i>Candida</i>	25
1.3 Patogenia e resposta imunológica.....	27
1.4 Onicomicoses	29
1.5 Epidemiologia de onicomicoses	33
1.7 Diagnóstico clínico e laboratorial de onicomicoses	37
1.8 Tratamento farmacoterapêutico de onicomicoses	39
1.9 Resistência antifúngica	40
1.10 Molécula: 2-Cloro- <i>N</i> -fenilacetamida.....	43
2.0 OBJETIVOS	46
2.1 Geral	46
2.2 Específicos.....	46
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Local de pesquisa.....	48
3.2 Aspectos éticos	48
3.3 Aspectos éticos: Estudo <i>ex vivo</i>	48
3.4 Substância 2-Cloro- <i>N</i> -fenilacetamida (A1Cl) e antifúngico padrão	49
3.5 Linhagens do gênero <i>Candida</i>	49

3.6 Meios de cultura	50
4.0 METODOLOGIA.....	50
4.1 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	50
4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	50
4.2 Detecção de alterações micromorfológicas de <i>Candida</i>	51
4.3 Ensaio de atividade antifúngica sobre a parede celular	51
4.3.1 Ensaio com o sorbitol.....	51
4.4 Ensaio de atividade antifúngica sobre a membrana plasmática	52
4.4.1 Ensaio com o ergosterol	52
4.5 Estudos de associação.....	53
4.5.1 Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Método de <i>Checkerboard</i>) de 2-cloro- <i>N</i> -Fenilacetamida associado com antifúngico padrão	53
4.6 Teste de sensibilidade de biofilmes em modelos <i>in vitro</i>	53
4.6.1 Efeitos de inibição da formação de biofilme	53
4.6.2 Efeito de ruptura de biofilme pré-formado	54
4.7 Teste de sensibilidade de biofilmes em modelos <i>ex vivo</i>	54
4.7.1 Aquisição de material biológico	54
4.7.2 Modelo de biofilme <i>ex vivo</i>	55
4.8 Modelos <i>in silico</i>	55
4.8.1 <i>Docking</i> Molecular	55
4.8.2 Dinâmica Molecular	56

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	59
6.2 Detecção de alterações micromorfológicas de <i>Candida</i> pela técnica de microcultivo	66
6.3 Ensaios de atividade antifúngica <i>in vitro</i> com alvos específicos da molécula A1Cl na parede celular fúngica	72
6.4 Ensaios de atividade antifúngica <i>in vitro</i> com alvos específicos da molécula A1Cl na membrana plasmática fúngica	75
6.5 Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Método de <i>Checkerboard</i>) de 2-cloro- <i>N</i> -Fenilacetamida associado com antifúngico padrão.....	77
6.6 Sensibilidade de biofilmes em modelos <i>in vitro</i>	80
6.7 Sensibilidade de biofilmes em modelos <i>ex vivo</i>	89
6.8 <i>Docking</i> Molecular	97
6.9 Dinâmica molecular.....	100
7.0 CONCLUSÃO.....	107
8.0 PERSPECTIVAS.....	109
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICES	131

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos fungos

Os fungos em épocas remotas foram considerados como vegetais, porém, por apresentar características que permitissem sua diferenciação das plantas, como o fato de não sintetizarem clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; possuírem parede celular composta de quitina ao invés de celulose (com algumas exceções) e capacidade de armazenar glicogênio, permitiu a sua classificação em um reino à parte denominado *Fungi* (MOORE et al., 2020).

Esta divisão está delimitada atualmente com base em características peculiares, que incluem aspectos morfológicos (macroscópico, microscópico e ultramicroscópico), bem como /fisiológicos. Apesar de muitas estruturas fúngicas serem similares dos animais, com os quais o reino está mais relacionado filogeneticamente, outras apresentam variações e outras ainda, são exclusivas dos fungos (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

Os fungos são caracterizados como organismos eucarióticos, heterotróficos formados por uma parede celular quitinosa espessa, por membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; mitocôndrias, complexo de Golgi, ribossomos ligados ao retículo endoplasmático; citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediário e por núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; DA SILVA; MALTA, 2016; BATODI et al., 2018).

Quando apresentam estruturas unicelulares são caracterizadas como leveduras e quando possuem estruturas pluricelulares apresentam hifas ramificadas e septadas ou não; todavia sua morfologia pode variar dependendo das condições ambientais, nutricionais e de temperatura (DA SILVA et al., 2014).

Essas descrições demonstram que esses microrganismos possuem células bastante semelhantes às hospedeiras o que implica diretamente elaborar estratégias terapêuticas específicas dirigidas contra esses fungos e que sejam atóxicas ao hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

1.2 Fungos do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* pertencem ao reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcacea (BARBIERI, 2014). Esse gênero, compreendendo aproximadamente 200 espécies, entretanto, apenas 20% são descritas como leveduras patogênicas em humanos (LIONAKIS; EDWARDS, 2015).

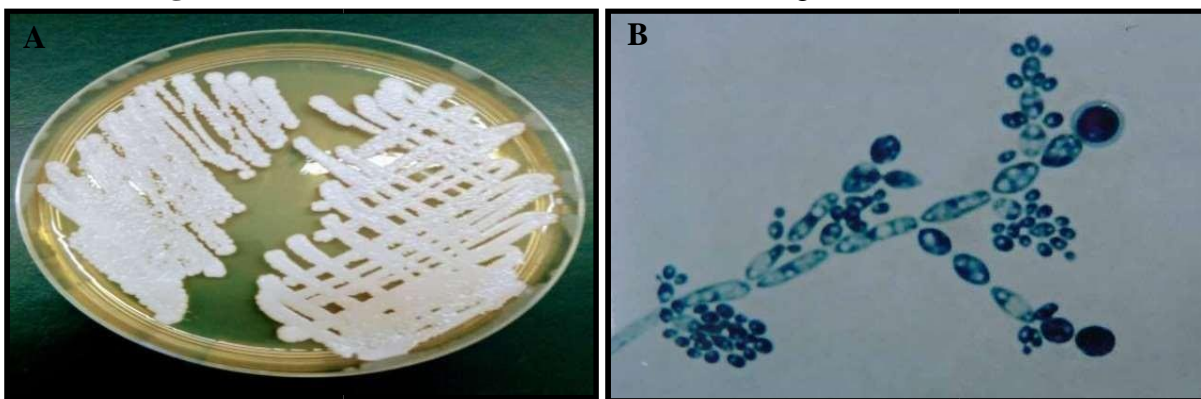
Esse microrganismos formam comunidades de espécies associados aos fatores físicos, químicos ou bióticos necessários para seu crescimento, denominados de autóctones quando necessitam de componentes essenciais para sobrevivência e alóctone quando transitórios ou presentes fortuitamente (STEPHENSON et al., 2022).

Em relação a sua morfologia, macroscopicamente são caracterizadas por consistência cremosa, brilhantes ou opacas, com coloração branca a creme, todavia podem apresentar coloração em cor marfim ao vermelho (GORTHI, 2019). Na microscopia as células leveduriformes podem variar de 5 a 8 µm de diâmetro, células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, parede celular delgada que se multiplicam quase sempre por brotamento na região polar, de modo que a célula-mãe origina uma gêmula, o blastoconídio. Uma vez formando células alongadas (pseudo-hifas) que se diferenciam de células verdadeiras (hifas) por apresentarem constrições nos septos (Figura 1) (GUPTA; GUPTA, 2017).

Conforme capacidade de reprodução de forma sexuada, são agrupadas em duas grandes classes: Ascomycetes (leveduras verdadeiras) que formam ascósporos no interior da célula e Basidiomycetes, capazes de elaborar esporos externos. Deuteromycetes (leveduras falsas) se reproduzem de modo assexuado formando um conjunto artificial de ascósporos ou basidiósporos, uma condição conhecida como estado anamorfo (STEPHENSON et al., 2022).

Nos últimos dez anos a Organização Mundial de Saúde (OMS), tem demonstrado que fungos patogênicos prioritários, são essenciais para guiar pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública, como *Candida albicans* uma levedura patogênica distribuída globalmente. Membro comum de microbiota de humanos na maioria dos casos, não produzem danos em condições saudáveis. No entanto, podem se multiplicar em mucosas e tecidos queratinizados quando ultrapassam as barreiras inatas e adaptativas, gerando doenças. As tendências de infecções por *C. albicans* nos últimos 10 anos são estáveis, mas as estimativas de incidência e espécies em distribuição parecem indicar que as infecções causadas por *C. albicans* estão caindo em relação a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, leveduras comensais distribuídas globalmente com potencial patogênico com propensão para formação de biofilmes (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2022), favorecendo para altas taxas de resistência e severidade em onicomicoses.

Figura 1: Características de macro e micromorfologia de *Candida albicans*.



Colônias de características cremosas e coloração branco-azul, semeados em Ágar Sabouraud Dextrose (A). Presença de pseudo-hifas, células alongadas e clamidoconídios (B). Aumento de 40x. **Fonte:** Autoria própria, 2020.

1.3 Patogenia e resposta imunológica

As infecções fúngicas, especialmente as onicomicoses iniciam-se por desequilíbrio entre microbiota, falha nas defesas imunológicas ou evasão do patógeno as respostas imunes, por meio de mecanismos extras e intracelulares, ou seja, quando ocorre depleção de fatores defensivos e aumento das ações dos principais fatores de virulência: aderência ao tecido do hospedeiro, formação de biofilmes, pleomorfismo, secreção de toxinas, enzimas hidrolíticas e variabilidade fenotípica (“switching”) (CAVALCANTE, 2017).

Os mecanismos de adesão dos microrganismos patogênicos às células hospedeiras são mediados por proteínas específicas, denominadas de adesinas, localizadas na parede celular fúngica que conferem aos fungos capacidade de aderir a proteínas, fibrinogênio, fibronectina e açúcares presentes na superfície celular do hospedeiro, bem como por fatores inespecíficos, como: propriedades físico-químicas, hidrofobicidade e forças eletrostáticas favorecendo desse modo o processo infeccioso (BRUNKE; HUBE, 2013, DEORUKHKAR; SAINI, 2016).

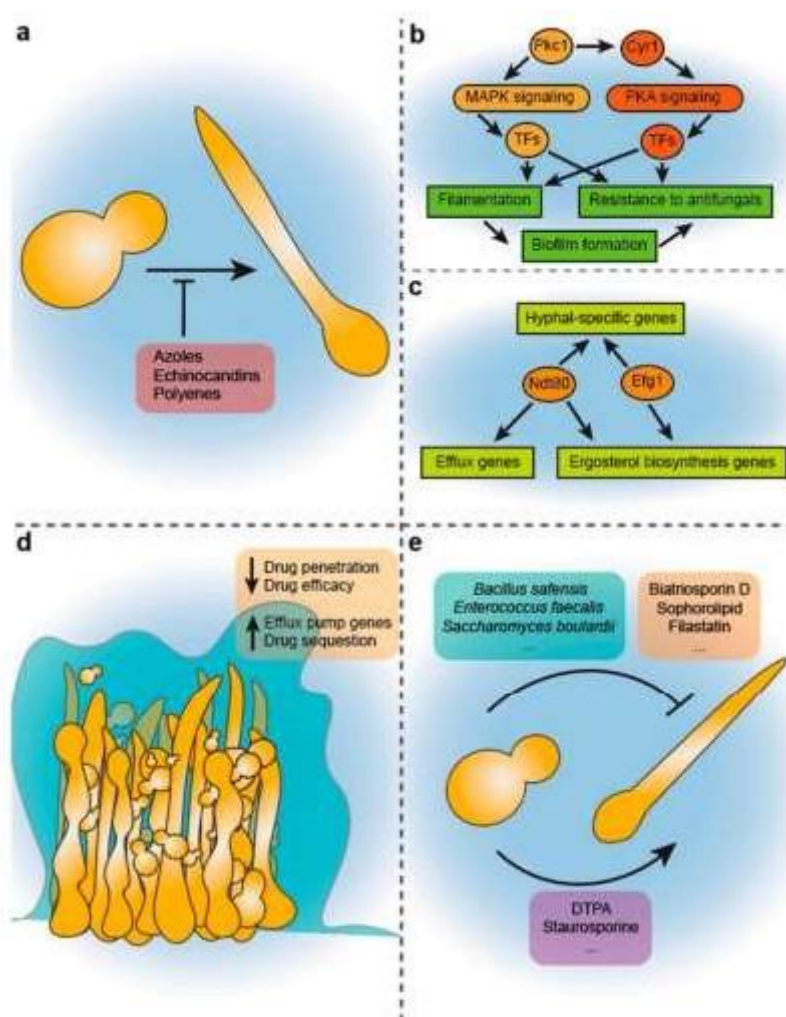
Posteriormente, no passo de iniciação, a proliferação das células leveduriformes e formação dos tubos germinativos refletem-se na formação de estruturas filamentosas - hifas e/ou pseudo-hifas favorecendo formação de biofilmes. Seguidamente, com a maturação dessa estrutura ocorre a acumulação dos constituintes a uma matriz extracelular, tornando-se assim a sua estrutura mais resistente (SHARMA et al., 2019).

Algumas espécies de *Candida* apresentam a capacidade pleomórfica de alternância reversível entre a forma de leveduras (crescimento isotrópico) e a filamentosa, hifa e/ou pseudo-

hifa (crescimento apical), caracterizando uma capacidade de germinação de fatores de virulência, favorecendo maior resistência à fagocitose e facilitando a novos processos de adesão e invasão das células hospedeiras (Figura 2) (SHARMA et al., 2019).

Além disso, a alternância de morfologia é também controlada por mecanismos de reguladores de transcrição e transdução de sinal, como proteína cinase A (PKA) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (SHARMA et al., 2019).

Figura 2: Principais vias de sinalização celular de regulação de morfogênese em espécies de *Candida*.



A - Morfogênese de *Candida* pode ser bloqueada com tratamento com compostos antifúngicos, incluindo azóis, equinocandinas e polienos. B - Interações entre vias de sinalização que governam a morfogênese e a resistência a drogas. A via da proteína quinase C (PKC)-MAPK e a via cAMP-PKA estão envolvidas em resistência a drogas e morfogênese em *Candida*. C - Regulação transcricional da resistência a drogas antifúngicas e morfogênese. Os fatores de transcrição Efg1 e Ndt80 foram previamente ligados à modulação da expressão de hifas promovendo a filamentação. D - Acoplamento de morfogênese de *Candida* e resistência a drogas através de formação de biofilmes. Os biofilmes de espécies polimórficas de *Candida* são tipicamente compostos por diversas morfologias: hifas, pseudo-hifas e leveduras. **Fonte:** Adaptado de: Sharma et al., 2019.

As enzimas hidrolíticas extracelulares constituem o fator de virulência com maior significado na infecção por *Candida*, devido capacidade de degradação de queratina (principalmente em unhas), o colágeno e mucina das membranas epiteliais e mucosa da célula hospedeira, além disso, degradam componentes de defesa (imunoglobulinas, complemento e citocinas) acentuando os fatores de virulência, patogenicidade e progressão de infecção (DEORUKHKAR; SAINI, DEORUKHKAR; SAINI, 2016).

A capacidade de *switch* fenotípico “troca fenotípica” pode ser acompanhada por alterações na expressão de antígenos, morfologia das colônias e afinidades teciduais no hospedeiro por *Candida* spp. A troca pode fornecer às células patogênicas uma flexibilidade/plasticidade que resulta em adaptação do organismo às condições hostis impostas pelo hospedeiro, contribuindo para sobrevivência e propagação de infecção (CALDERONE; FONZI, 2001).

A imunidade inata é essencial para desencadear e modular a resposta imune adaptativa contra a infecção. Apesar de restrito às camadas superficiais, os fungos patogênicos podem desencadear processos inflamatórios. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como, receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo lectina e dectina-1 e dectina-2, que estão presentes nos queratinócitos, células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos, células B e T reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e participam no controle da ativação da resposta imune adquirida (GUPTA et al, 2016).

As respostas de perfil Th1 e Th17 podem ser responsáveis pela imunidade protetora contra fungos, enquanto se supõe que as respostas Th2 estão associadas a efeitos deletérios. As células Treg e Th17 induzidas podem surgir da mesma célula precursora e a diferenciação seletiva seria favorecida na presença do fator de crescimento transformador β (TGF- β), que determinaria a predominância de células Treg com atividade supressora ou células Th17 com atividades inflamatórias, determinando a progressão e grau da doença. Os processos imunológicos para onicomicoses é pouco conhecida, de modo que uma compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das respostas imunes à doença pode fornecer novas abordagens moleculares e direcionar novos alvos para a terapia antifúngica (GUPTA et al, 2016).

1.4 Onicomicoses

Os fungos do gênero *Candida* estão associados às onicomicoses, uma afecção normalmente assintomática, apresentando-se no início de sinais clínicos alterações do aspecto da unha com espessamento da placa ungueal. Geralmente há onicólise, queratose subungueal,

alteração de coloração, branco-amarelado até o acastanhado (melanoníquia), onicorrexe e onicodistrofia. Conforme progressão da lesão pode progredir e causar desconforto, dor, parestesia e implicações nas atividades diárias (SCHALLER et al, 2017).

As unhas acometidas tornam-se frágeis, finas, desfiguradas e discrômicas. Esta condição patológica afeta a qualidade de vida, com perda da autoestima do paciente podendo resultar em limitações físicas, ocupacionais e sociais (FLORES et al, 2016). Dentre os principais fatores relacionados à onicomicose estão umidade, uso prolongado de calçados fechados, trauma ungueal repetitivo, predisposição genética e doenças crônicas (CANESCHI et al, 2017).

Essa afecção pode ser classificada, conforme a extensão, comprometimento, localização da lesão e coloração (TOSTI; PIRACCINI, 2018):

- Onicomicose subungueal distal e lateral, é a forma mais comum dessa infecção, os microrganismos infectantes invade o leito da unha, começando pelo hiponíquio e migração para a região proximal da unha através da matriz subjacente. Além do mais, ocorre uma hiperqueratose subungueal, ocasionando a ruptura e coloração amarelada da lâmina da unha, conforme figura 3 (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015, FREEDMAN; TOSTI, 2017, GUPTA et al, 2018).

Figura 3: Onicomicose subungueal distal e lateral



Fonte: Adaptado de Piraccini e Alessandrini (2015).

- Onicomicose superficial branca, os fungos invadem a placa ungueal dorsal e formam colônias que aparecem como formações brancas opacas, facilmente raspadas, como pode ser visualizado na figura 4. O diagnóstico diferencial inclui fragilidade superficial das unhas devido ao uso prolongado de esmalte e leuconíquia transversal da unha devido a trauma (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015).

Figura 4: Onicomicose distal e lateral



Fonte: Adaptado de Mlacker e Tosti (2017).

- Superficial subungueal proximal, é um subtipo relativamente incomum, e ocorre quando o fungo infectante invade a unha pela região proximal por meio da área da cutícula e migração para a região distal com uma reação inflamatória leve, onicólise proximal, leuconíquia e destruição da lâmina na região da proximal, como visualizado na figura 5 (GLINOS; TOSTI, 2017, GUPTA et al, 2018).

Figura 5: Onicomicose superficial subungueal proximal



Fonte: Adaptado de Piraccini e Alessandrini (2015).

- Endonix é caracterizada por invasão maciça da placa ungueal na ausência de envolvimento do leito ungueal. Clinicamente, a unha afetada pode mostrar uma divisãolamelar e uma descoloração branca leitosa. A placa ungueal está firmemente presa ao leito ungueal e não há hiperqueratose ou onicólise no leito ungueal, conforme figura 6 (LIPNER; SCHER, 2019, LEUNG et al, 2020).

Figura 6: Onicomucose Endonyx



Fonte: Adaptado de Shah e Tosti (2017).

- Distrofia total corresponde ao estágio mais grave da onicomucose, e pode resultar de uma onicomucose subungueal distal e lateral ou onicomucose proximal subungueal de longa duração em que a placa ungueal é difusamente espessada, friável, com completa destruição das camadas de queratina das unhas, conforme figura 7 (GUPTA et al., 2018, LEUNG et al, 2020).

Figura 7: Onicomucose em distrofia total



Fonte: Adaptado de Mohanty et al. (2019).

Essa doença merece atenção porque em casos não tratados têm o potencial de levar a complicações graves, como ulceração de dedos e pés, ou até mesmo amputações de membros em virtude de infecções oportunistas (GUPTA et al., 2018).

1.5 Epidemiologia de onicomicoses

Até o século XIX, a onicomicose era considerada uma infecção rara, descrita pela primeira vez por Meissner, um estudante alemão em 1853. Entretanto sua prevalência foi aumentando a partir da primeira metade do século XX, provavelmente por mudanças em migração populacional o que ocasionaram a translocação e distribuição de espécies fúngicas.

Além disso, mudanças relacionadas ao estilo de vida, como uso prolongado de calçados fechados, traumas repetitivos no leito ungueal, hiperidrose excessiva, doenças vasculares periféricas e resistências as terapias convencionais também são fatores predisponentes às onicomicoses (GUPTA et al., 2021).

Essas afecções fúngicas são ocasionadas predominantemente por espécies de *Candida* spp, sendo responsável por cerca de 40% de todas as doenças que acometem o leito ungueal e suas estruturas adjacentes (REINEL, 2021), afetando 1 em cada 10 pessoas em algum momento de suas vidas, cada vez mais recorrentes se tornando um problema de saúde pública mundial (RIGOPOUDOS et al, 2018).

Em estudo epidemiológico foi evidenciado que a prevalência mundial de onicomicose é estimada em 5,5%, usando pacientes como unidades de análises (GUPTA et al., 2021). Comparativamente, tem sido estimado previamente que a onicomicose tem uma prevalência de 2% a 8%, representando 50% dos casos de doença ungueal e que por meio dessas estimativas anteriores, a prevalência dessa infecção foi relatada como sendo de 4,3% em estudos laboratoriais e 8,9% em estudos hospitalares (GUPTA et al, 2017).

A prevalência de onicomicose é maior na população ocidental por uma faixa de margem de 2/3% - 13%, presumivelmente devido a mudanças no estilo de vida e ao envelhecimento populacional (AGGARWAL et al., 2020). Aproximadamente 20% de indivíduos com faixa etária de 60 anos e 50% com idade igual ou superior a 70 anos e até um terço dos diabéticos são acometidos por onicomicoses (THOMAS et al., 2010, ATAÍDES, 2010).

No que se diz respeito ao gênero tanto homens mulheres podem ser acometidos, com uma maior incidência e prevalência para homens (THAMPI et al., 2021). Além do mais, a incidência e prevalência de onicomicoses nas unhas das mãos e dos pés pode variar conforme o gênero. Essa diferença foi comprovada no estudo desenvolvido por Souza et al., 2009 em que foi postulado que onicomicoses pés foram mais frequentes em pessoas do gênero masculino e nas

mãos no gênero feminino.

No Brasil por meio de um estudo realizado no período de 2013 a 2014, a prevalência foi estimada próximo aos 11,9% (GUPTA et al, 2017). No entanto, estudos recentes mostram que no Brasil, 28,3% da população sofrem de onicomicoses (DE SOUZA COSTA et al., 2022).

Estudo realizado na região Sudeste, mostrou uma prevalência de onicomicose no estado de São Paulo, de 588 pacientes analisados foi confirmado o diagnóstico micológico para onicomicose em 42%. Ao passo que, no Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre uma taxa de 58% de um total de 840 pacientes, foram diagnosticados com onicomicoses em unidades ambulatorias (DA SILVA FAY et al., 2019). Na Centro-Oeste, no estado de Goiás estudos demonstraram uma prevalência de 56,4% em 2273 pacientes com suspeitas clínicas de onicomicoses (ATAÍDES, 2010).

Além do mais, estudos epidemiológicos de onicomicoses desenvolvidos na região Nordeste mostraram uma prevalência de 52% em um total 976 pacientes analisados do estado do Ceará e uma positividade de 58% de um total de 288 amostras de escamas ungueais (ATAÍDES, 2010). No estado de Alagoas, prevalência em unhas dos pés correspondeu a 876/23,2% e unhas 589/15,6% (DE ALBUQUERQUE MARANHÃO et al, 2019).

Um estudo realizado por Arrua et al. (2010) no município de João Pessoa-Paraíba mostrou que de um total de 693 pacientes, 87,5% eram do sexo feminino, 59,2% eram pessoas afrodescentes e a faixa etária mais afetada foi de 41 a 60 anos correspondendo a 41% dos pacientes avaliados; 24% foram de 21 a 40 anos e 24% correspondia a faixa de 61 a 80 anos, demonstrando a prevalência desta doença em indivíduos do gênero feminino, adultos e idosos, respectivamente.

A epidemiologia de onicomicoses em grande parte reflete aos fatores ambientais, em que a variação global na prevalência dessa infecção poderia ser atribuída à geografia, como onicomicose devido a espécies de *Candida* são frequentemente encontrados em climas quentes e úmidos, enquanto que onicomicose devido a dermatófitos são frequentemente encontrados em climas temperados (GUPTA et al, 2017).

No entanto, um papel crescente de fungos não dermatófitos, principalmente leveduras têm demonstrando um papel crescente no desenvolvimento de infecções em unhas. Espécies do gênero *Candida* são responsáveis por 10% a 20% dos casos com onicomicose. Além disso, foi sugerido que esses microrganismos são agentes causadores significativamente mais prevalentes em onicomicoses quando comparados aos dermatófitos (TAMER; YUKEL, 2019).

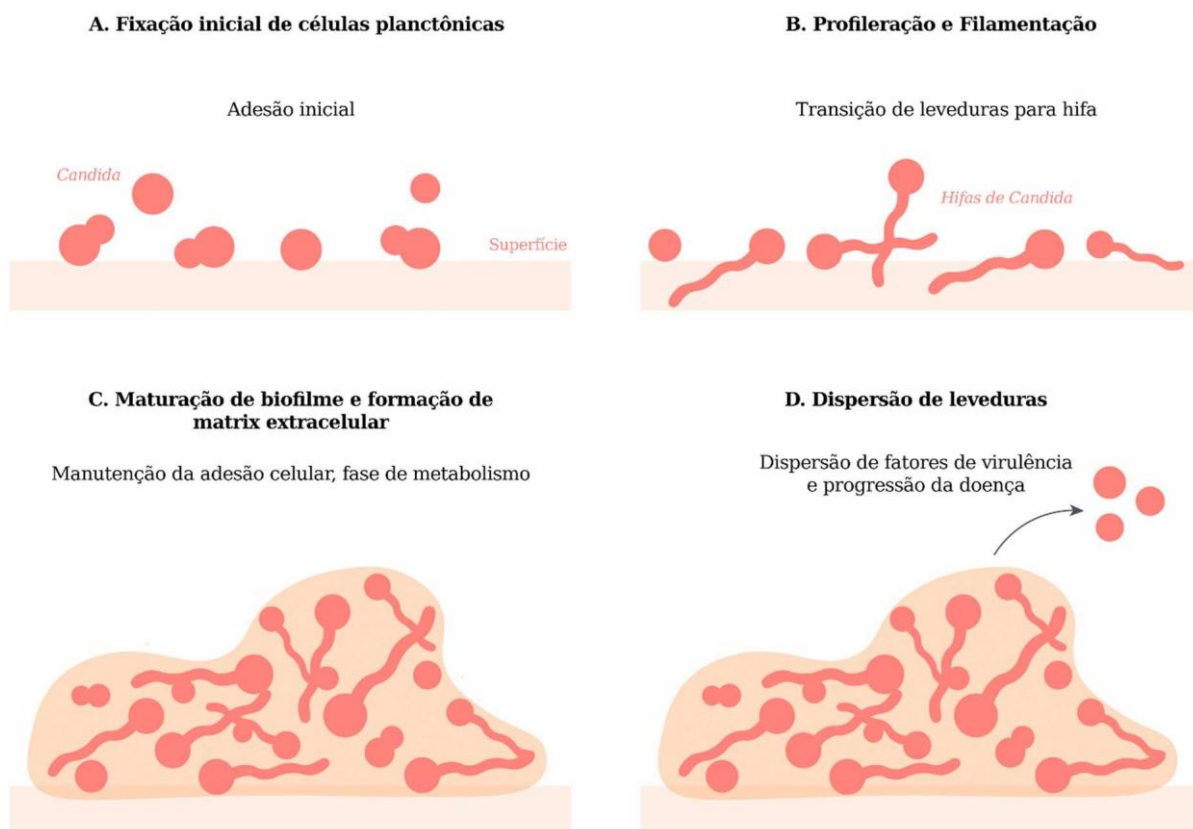
1.6 Biofilmes

Nas últimas décadas, a pesquisa no campo de biofilmes microbianos ganhou impulso crescente e evidências científicas emergentes mudaram a compreensão de como a vida microbiana, durante os processos infecciosos (PEREIRA et al., 2021). Uma importante característica de virulência de *Candida* é sua capacidade de formar biofilmes. Biofilmes são comunidades estruturadas de células com várias centenas de microns de espessura, formados por uma mistura de células de levedura, pseudo-hifas e hifas cercadas por uma matriz extracelular exopolimérica, aderente em superfícies mucosas e revestimentos celulares epiteliais (LOHSE et al., 2020).

Uma vez, instalados em tecidos, biofilmes são tipicamente resistentes a drogas antifúngicas nas concentrações que normalmente são eficazes contra células planctônicas (flutuantes), exigindo concentrações mais altas de drogas, o que pode levar a efeitos colaterais no hospedeiro.

Além disso, a interação de espécies microbianas-fúngicas em biofilme misto leva ao desenvolvimento de resistência a drogas e mecanismos de proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro (KHAN et al., 2021), favorecendo severidade, progressão e recidivas do processo infeccioso.

No geral, o processo de desenvolvimento de biofilmes fúngicos, podem ser divididos em quatro fases principais: adesão, proliferação, maturação e dispersão (PEREIRA et al., 2021) (Figura 8).

Figura 8: Mecanismos de formação de biofilmes fúngicos.

Mecanismos para formação de biofilmes em infecções fúngicas por *Candida sp.* **Fonte:** Adaptado de GUPTA et al., 2020.

No início, na fase de aderência, as células de levedura se ligam a uma superfície biótica ou abiótica e formam uma camada basal. Esses eventos de contato iniciais compreendem vários fatores não específicos, incluindo forças atrativas e repulsivas (como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e forças de movimento browniana) e interações eletrostáticas associados à adesinas e integrinas que facilitam a adesão inicial, sendo um pré-requisito importante para a formação do biofilme (PONDE et al., 2021).

Isto é seguido por uma fase de proliferação, que é caracterizado pelo início da filamentação. Essa etapa de formação de biomassa celular envolve a formação de filamentos, em que células de levedura alongam-se e desenvolvem-se em hifas filamentosas. Este é o passo de iniciação de invasão aos tecidos do hospedeiros. Um arsenal de enzimas hidrolíticas, como proteinases, hemolisinas e fosfolipases, são secretadas, de modo que proteases aspartil secretadas (SAPs), são as mais estudadas e de interesse como alvo terapêutico (PEREIRA et al., 2021).

Na fase de maturação, a produção de hifas é acompanhada pela secreção de substâncias

poliméricas extracelulares (EPS) que cobre a superfície da colônia e liga as células para formar a base estrutural do biofilme e agregação de hifas. As EPS de biofilme de *Candida* são complexos, associados a estruturas de células pseudohifais e hifais envoltas por α -manana, β -1,6-glucana e β -1,3-glucana (polissacarídeos), glicoproteínas, lipídios e material genético. Embora o β -1,3 glucano seja um constituinte menor, é o principal polissacarídeo da matriz ligado à resistência do biofilme aos antifúngicos, pois pode bloquear a difusão da droga (SUBROTO et al., 2022).

Durante a fase de dispersão, o número de células fúngicas é extenso, os nutrientes são insuficientes, sob estresse de ambientes internos e externos, o biofilme entrará no estágio final de seu ciclo. A dispersão do biofilme é dividida em dispersão autoiniciada que se manifesta principalmente na inibição da produção de matriz extracelular, produção de enzimas que podem degradar componentes extracelulares e aumento da motilidade celular. A dispersão espontânea inicia a partir do biofilme parcial com lise de células mortas e liberação de enzimas que contribuem para a degradação do EPS. A força de cisalhamento do fluido separa fisicamente o biofilme e as células dispersas do biofilme transformam-se gradualmente em planctônicas e procuram o próximo local de fixação (XU et al., 2022).

Portanto, a estrutura do biofilme pode variar e continuar se reorganizando à medida que eles se adaptam ao ambiente sob influência de oxigênio, temperatura e nutrientes (XU et al., 2022).

1.7 Diagnóstico clínico e laboratorial de onicomicoses

O diagnóstico de onicomicoses é baseado no diagnóstico clínico, que envolve todo o histórico clínico do paciente, identificação dos microrganismos infectantes, diagnóstico laboratorial e mais recentemente, a utilização de registro de imagens com técnicas mais sofisticadas (SILVA, 2017, TORRES-GUERRERO; ARENAS, 2017).

O diagnóstico clínico dessa afecção é caracterizado pela presença de hiperqueratose do leito ungueal, frequentemente levando à onicólise, com deslocamento do leito ungueal ou placa distal da unha. Além disso pode ser evidenciado pelo clínico detritos subungueais e discromia, caracterizado por uma coloração branca/amarela ou marrom da placa ungueal. Em casos clínicos prolongados ou infecção recidivantes o diagnóstico é baseado em distrofia ungueal, espessamento, desintegração, sulcos, rachaduras e/ou perda parcial de unhas (LIPNER et al, 2018, LIPNER; SCHER, 2019).

Os exames micológicos são constituídos por duas etapas: exame microscópico direto e

cultura (BEUSCHER; KELECHI, 2019). Para primeira etapa, o material coletado da unha afetada é imerso em solução de cloreto de potássio 40% (KOH 40%), necessário para dissolver os queratinócitos da amostra biológica, tornando-o mais amplo e diminuindo o reflexo das bordas das possíveis estruturas fúngicas, sob microscopia óptica auxiliando em detecção e confirmação de hifas, pseudo-hifas e/ou blastoconídios (LIPNER; SCHER, 2019). Todavia a presença de KOH não permite reconhecer o tipo de fungo causador da onicomicose, sendo uma técnica pouco sensível e que não determina a viabilidade celular fúngica. Para isso, se faz necessário uma cultura para um diagnóstico mais específico (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015).

As culturas para isolamento e identificação das espécies a partir do material biológico é o procedimento mais viável em rotina laboratorial, sendo considerado o padrão de excelência no diagnóstico de onicomicoses (JELLINEK, 2019).

Os detritos subungueais são raspados e imediatamente transferidos para placas de petri com ágar sauboraud dextrose (ASD) e são adicionados cloranfenicol e/ou gentamicina na proporção de 100 µg/mL ao ágar para reduzir os contaminantes bacterianos. Por fim, as culturas são cultivadas até 48h sob temperatura $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para espécies de leveduras. Todavia, as limitações desta técnica, como o tempo de crescimento de isolados clínicos, sensibilidade do método e alta taxa de resultados falsos negativos, faz-se necessário a utilização de novos métodos de diagnóstico (DE BRUYNE et al, 2019).

A histopatologia dos fragmentos de unhas é um método sensível e relativamente rápido, para o diagnóstico de onicomicose, com coloração por meio de ácido periódico de Schiff (PAS) ou hematoxilinaeosina (HE) permitem fácil visualização de esporos e/ou hifas fúngicas (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015, FLORES-GAVILÁN, 2017).

Existem diferentes técnicas mais avançadas, para o diagnóstico de onicomicoses, como: técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), microscopia confocal e tomografia de coerência óptica (PETROKILIDOU, 2020). Todavia, não são empregados na prática clínica, devido ao alto custo e por requerer uma demanda de profissionais especializados para o diagnóstico.

Vale ressaltar que um diagnóstico incorreto pode ocasionar implicações, como recidivas da infecção, riscos de exposição do indivíduo a fármacos com significativos efeitos colaterais e/ou adversos e farmacoterapia ineficaz e onerosa. Em contrapartida, um diagnóstico correto possibilita um isolamento e identificação dos microrganismos envolvidos na afecção, possibilitando a prescrição de um tratamento antifúngico racional, eficaz, seguro, menos tóxico e limitações de resistências aos fármacos (SILVA, 2017; LIPNER; SCHER, 2019).

1.8 Tratamento farmacoterapêutico de onicomicoses

A onicomicose é uma infecção crônica, recidivante com tratamento baseado na erradicação do microrganismo infectante, e ao mesmo tempo em proporcionar regressão de sinais e sintomas, com restauração de aspectos morfológicos e fisiológicos das unhas. Além disso, a escolha de tratamento baseia-se no tipo, patógeno, subtipo de onicomicose, envolvimento da matriz ungueal, número de unhas infectadas, localização (dedos dos pés ou das mãos), espessura da placa ungueal e coexistência de outras micoses com localização diferente (TABARA et al, 2015).

Atualmente, existem três estratégias farmacológicas principais - tratamento tópico, tratamento oral e terapia combinada. Para isso, inicialmente são utilizados tratamentos de usos tópicos, como amorolfinas nas 5%, ciclopirox 8%, e solução de tioconazol 28%.

A amorolfinas, um derivado da morfilina com efeitos fungistático e fungicidas, inibe a síntese de ergosterol em dois níveis: inibindo as enzimas, Δ -14-redutase e Δ -7-8 isomerase, diminuindo a síntese de ergosterol e proporcionando acúmulo de esteróis esféricos não típicos em membranas citoplasmáticas fúngicas, ocorrendo desestabilização e ruptura de suas estruturas, com extravasamento de líquidos e minerais (FENG et al, 2017, AGGARWAL et al, 2020).

O ciclopirox, fármaco protótipo da classe das hidroxipiridonas são ácidos fracos que mostram atividade antimicrobiana de amplo espectro, agem diminuindo atividade de enzimas dependentes de metais (quelando cátions trivalentes 3^+), levando a menor degradação de peróxidos citoplasmáticos, aumento da sensibilidade das células ao estresse oxidativo e diminuição dos níveis de permutas ou transportadores de ferro (SAHNI et al, 2018). Por sua vez, o tioconazol favorece inibição do citocromo-P450, presente na biossíntese de ergosterol (AGGARWAL et al, 2020).

No entanto, altas taxas de remissão e/ou cura da doença são difíceis de serem obtidas, pois a placa ungueal atua como uma barreira física para tratamentos tópicos e funcionam como reservatório para crescimento fúngico, resultando em baixas taxas de cura clínica em torno de 35-50% e altas taxas de recidiva em torno de 10-53% (GUPTA; STUDHOLME, 2016).

Por sua vez, para os tratamentos orais/sistêmicos, são utilizados fármacos, como terbinafina, uma alilamina que funciona como um inibidor não competitivo da enzima esqualeno epoxidase que inibe o desenvolvimento funcional da membrana celular dos fungos (GUPTA et al, 2020) e os fármacos da classe dos azóis, como itraconazol e fluconazol que inibem a síntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica, interferindo na

atividade da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol (HOSSAIN et al., 2022), são recomendados para infecções moderadas (20%-60) com comprometimento parcial da placa ungueal e em casos de onicomicose grave (> 60%), com comprometimento total da unha, mas pode resultar em interações medicamentosas, aumento do risco de hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca congestiva (GUPTA et al, 2017).

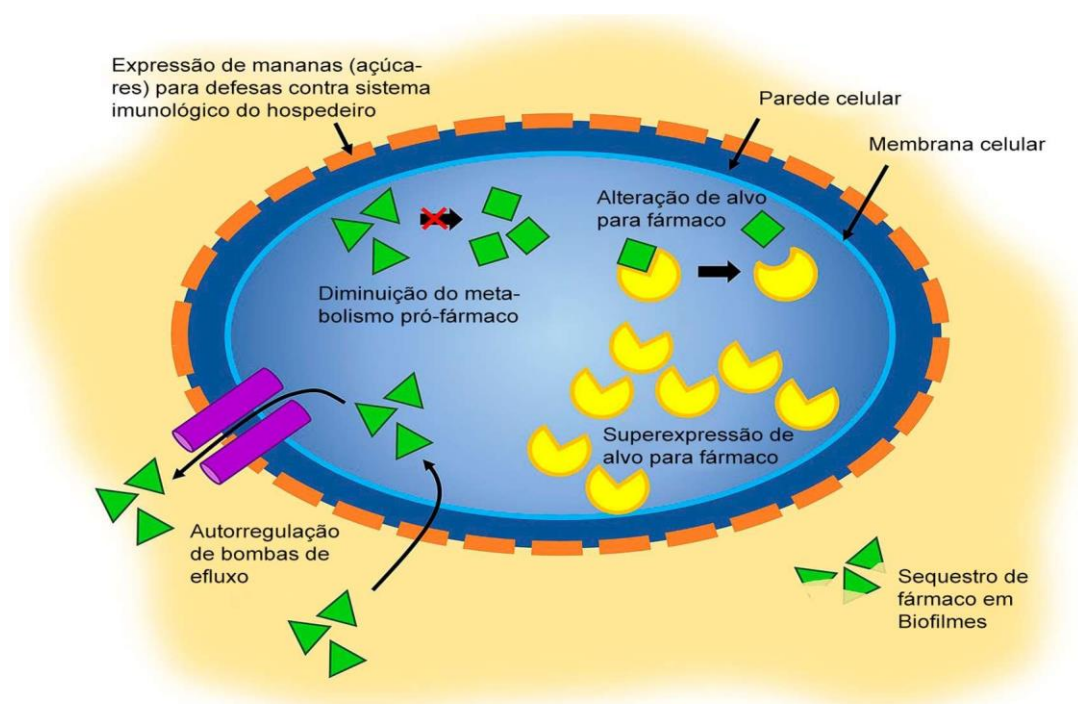
Apesar dos recentes avanços na medicina, o tratamento da onicomicose permanece desafiador devido às características anatômicas das unhas e à baixa eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis na prática clínica. As terapias existentes para onicomicose são apenas parcialmente eficazes, com alta taxa de recidiva com consequente resistência fúngica. Desta forma, é urgentemente necessário o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas que sejam mais eficazes, seguras, econômicas e menos tóxicas.

1.9 Resistência antifúngica

Os alvos antifúngicos são limitados devido às semelhanças estruturais das células fúngicas e humanas. Como resultado, as opções de tratamento tornam-se restritas favorecendo o surgimento de resistência antifúngica. Essa observação destaca ainda mais a importância de entender os mecanismos e efeitos da resistência, o que pode levar a abordagens terapêuticas mais eficientes (BOHNER et al., 2022).

De uma forma geral, diversos mecanismos bioquímicos contribuem para o desenvolvimento do fenótipo de resistência, como: alterações no alvo molecular do fármaco, superexpressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese do ergosterol, perda de porinas, “super-expressão” da molécula alvo e produção de enzimas fúngicas degradantes do fármaco (Figura 9), fazem parte desse perfil (GUPTA et al., 2021).

Figura 9 - Principais mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos.



Mecanismos moleculares de resistência antifúngica que envolvem autorregulação de bombas de efluxo, alterações de parede e membrana celular, alteração de alvos moleculares e superexpressão de alvos para drogas. **Fonte:** Adaptado de Gupta et al. 2021.

Um dos principais mecanismos de resistência a azóis em espécies de *Candida* é através do efluxo ativo de drogas mediado por transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC) e bombas da superfamília de facilitadores principais (MFS); codificados pelos genes *Candida* Resistente a Drogas CDR e Resistência a Multidrogas MDR, favorecendo redução da concentração de droga em meio intracelular, necessária para produzir efeito terapêutico (EL-GANINY et al., 2022).

O transportador ABC CDR1 é relatado como o principal contribuinte para a resistência a azóis em isolados clínicos de *C. albicans* e *C. glabrata*. Enquanto, *C. tropicalis*, a mutação ERG11 foi o principal mecanismo responsável pela resistência a azóis, no entanto, a superexpressão de CDR1 e MDR1 também contribuiu para a resistência a azóis (EL-GANINY et al., 2022).

A alteração da enzima-alvo ou sobre expressão do gene que a codifica - ERG11 - constitui um outro mecanismo que confere resistência aos azóis. A alteração por modulação positiva de resistência da enzima ocorre por mutações pontuais no gene ERG11, responsável pela codificação de enzima alvo C-14- α -desmetilase o que evita a sua ligação aos derivados

triazólicos ao sítio enzimático, por redução da sensibilidade (PAUL et al., 2022).

Além do mais, envolve o desvio de via do ergosterol por mutações em ERG3. De modo que há não formação de 14- α -metil-3,6-diol (produto tóxico), e sim a substituição por 14- α -methilfecosterol, promove a anulação dos efeitos perturbadores causados na membrana pelos azólicos (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

No que se diz respeito aos polienos (nistatina e anfotericina B) a resistência de espécies de *Candida* está relacionada também as mutações no gene ERG3 assim como, na presença de possíveis alterações em outros genes reguladores de enzimas formadoras do ergosterol (ERG1, ERG25) e β -1,6-glucano (SKN1, e KRE1), principalmente em espécies formadora de biofilmes (ESPINEL-INGROFF, 2008)

Foi demonstrado que alterações genéticas na via biossintética do ergosterol ou nos genes ERG diminuem a sensibilidade a polienos. O gene ERG3 codifica Δ 5, 6 esterol dessaturase, que é necessário para biossíntese de ergosterol. Além disso, genes de estresse celular e ERG5, ERG6, e ERG25 foram regulados positivamente quando as diferenças na expressão dos genes ERG, promovendo falta de ergosterol e resistência aos polienos (MCCARTHY et al., 2017).

As mutações que determinam a resistência fúngica às equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, e micafungina), estão localizadas em duas regiões altamente conservadas de genes que codificam a subunidade Fks de β -1,3-D-glucano sintase, denominadas "hot spots" (HS). As mutações são agrupadas em duas regiões "hot spot": *HS1* que codifica aminoácidos nas posições 641-649 da enzima e *HS2* responsável por codificar resíduos de aminoácidos 1345–1365 na proteína Fks1 em *Candida* e regiões homólogas de Fks2, alterações adquiridas na estrutura da subunidade Fks são principalmente substituições de aminoácidos, mas deleções e códon "stop" alternativos, tornando-os menos suscetíveis às equinocandinas (SZYMAŃSKI et al., 2022).

Os mecanismos de resistência a flucitosina envolvem mutações em enzima citosina permease (codificada pelo gene FCY2), responsável pela internalização do fármaco na célula fúngica; alterações na enzima citosina desaminase (codificada pelo gene FCY1), responsável pela conversão de flucitosina a 5-fluorouracil; ou mudanças na enzima uracila fosforibosil transferase, que é responsável pela transformação de 5-fluorouracil em monofosfato de 5-fluorouridina (codificada pelo gene FUR1) que impossibilita o comprometimento em RNA e síntese proteica da célula fúngica (ESPINEL-INGROFF, 2008). O que vem sendo observado é que especificamente a maioria destes mecanismos é direcionado a *C. albicans* (PFALLER, 2012).

Os mecanismos de resistência a flucitosina (5-FC) pode resultar da perda ou mutação de

qualquer uma das enzimas envolvidas na ativação da citosina permease (codificada pelo gene FCY2), citosina desaminase (codificada pelo gene FCY1), responsável pela conversão de flucitosina a 5 – fluorouracil, uracil fosforibosiltransferase é responsável pela transformação de 5-fluorouracil em monofosfato de 5- fluorouridina (codificada pelo gene FUR1) ou do aumento da produção de pirimidinas. No entanto, a ausência de mutações nessas enzimas em muitos isolados clinicamente resistentes a 5-FC levou à hipótese da existência de outros mecanismos que poderiam regular a resposta das células fúngicas, além dos genes envolvidos nas vias de resgate da pirimidina (DELMA t al., 2021).

Nos últimos anos, fármacos utilizados na prática clínica não se mostram suficientes para suprir a demanda crescente de infecções causadas por espécies de *Candida*. Tal fato, está diretamente relacionado a resistência natural ou adquirida contra aos antifúngicos e aos efeitos adversos e toxicidade de alguns fármacos, o que justifica a pesquisa urgente de novas moléculas sintéticas com melhores perfis microbiológicos (BERTO et al., 2018).

Nesse contexto, o desenvolvimento e pesquisa de produtos sintéticos bioativos constitui não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas, contribui no conhecimento de suas propriedades químicas e estruturas tridimensionais para auxiliar em modificações estruturais visando otimização de suas propriedades farmacológicas e que podem ser usadas como matrizes para a descoberta de protótipos candidatos a novos fármacos. Estratégias como essas podem contribuir na redução dos índices de morbidades, promovendo uma melhor adesão ao tratamento e no estado de saúde dos indivíduos que sofrem com o uso da terapêutica atual.

1.10 Molécula: 2-Cloro-*N*-fenilacetamida

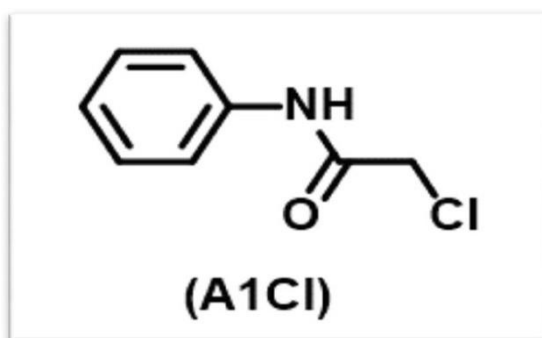
Os grupos amidas são grupos funcionais orgânicos significativos em compostos sintéticos devido às suas propriedades reativas e químicas com seus alvos biológicos e esses mesmos grupos compreendem peptídeos encontrados em várias proteínas (CANESHI et al., 2017).

Relatos na literatura têm demonstrado um interesse considerável em estudos de prospecção com substituições para derivados acetanilida presente em várias drogas sintéticas, uma vez que a presença desse grupo funcional está relacionado com atividades antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica e antiviral (ASCHALE, 2012).

No grupo acetamida, a presença do átomo de cloro parece melhorar a atividade antimicrobiana dessas moléculas. Em um estudo de Bravo et al. (2003) a atividade

antimicrobiana de *N*-(2-hidroxifenil) acetamida contra *Candida albicans* foi avaliada e foi observado, a ausência de atividade contra este microrganismo. Todavia, a mesma substância com a adição de um átomo de cloro (2-cloro-*N*-(2-hidroxifenil) acetamida) foi capaz de inibir 96,6% de uma cepa de *Candida albicans*. Portanto, a adição de cloro ao carbono alfa fez com que a molécula apresentasse uma boa atividade contra esse fungo patogênico. Nesse contexto a sintética 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas (A1Cl) é uma molécula (figura 10) amplamente obtidas em processos de síntese orgânica como intermediários de reações que podem ser utilizadas para obtenção de outras moléculas farmacologicamente ativas com efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e analgésico (YADAV et al., 2018).

Figura 10: Estrutura química de 2-Cloro-*N*-Fenilacetamida



Fonte: Autoria própria (2023).

A ocorrência de fenilacetamidas, não é comum em plantas, mas a síntese aplicada dessas estruturas, apresentam importantes atividades biológicas, como propriedades antitumorais (CHIMENTO et al., 2022), anti-inflamatória e antioxidante (ARIF et al., 2022), antibacteriana (Cordeiro et al., 2020) e antifúngica (MELO et al., 2020).

Moléculas cloradas têm uma alta atividade antimicrobiana inibitória, e foi comprovado que derivados clorados possuem atividade microbiana superior em cepas fúngicas do que seus análogos fluorados e bromados (LIU et al., 2019).

Tendo em vista o potencial antifúngico de acetamidas e cloroacetamidas e necessidade urgente de desenvolver novas alternativas terapêuticas no tratamento de onicomicoses até o momento, em pesquisas realizadas em base de dados, não foram encontrados relatos de estudos farmacológicos *in vitro* a respeito da atividade fungistática e/ou fungicida para o composto teste 2-cloro-*N*-Fenilacetamida (A1Cl), seus mecanismos de ação contra espécies do gênero *Candida* e estudos de análises *in silico* sendo este o foco do presente estudo.

Objetivos

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Avaliar a atividade antifúngica de 2-cloro-*N*-Fenilacetamida (A1Cl) contra espécies do gênero *Candida* de onicomicoses.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da substância A1Cl e do antifúngico padrão.
- ✓ Avaliar a interferência da molécula A1Cl e fluconazol sobre a micromorfologia fúngica.
- ✓ Elucidar os possíveis mecanismos da molécula A1Cl com ênfase sobre a parede celular e membrana plasmática fúngica.
- ✓ Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (método de associação - *checkerboard*) da molécula A1Cl com o fluconazol.
- ✓ Avaliar a atividade da molécula A1Cl por meio do modelo de antibiofilmes *In vitro e Ex vivo*
- ✓ Avaliar os possíveis alvos moleculares de A1Cl por meio de estudos de *docking* e dinâmica molecular.

Materiais e Métodos

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de pesquisa

Os estudos de investigação de atividade antifúngica foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica, situado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Ativos, sob coordenação da Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveria Lima.

3.2 Aspectos éticos

Solicitado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com base na Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466 de 12 de dezembro de 2012, item IV.8 que contempla a dispensa do TCLE em situações de impossibilidade de obtenção do mesmo, para todos os ensaios *in vitro*. Essa solicitação foi fundamentada por ser um estudo experimental, quali-quantitativo, analítico-descreutivo que contempla microrganismos isolados a partir de exames micológicos de indivíduos com onicomicose, que se encontram armazenados em uma instituição privada, localizada no município de João Pessoa-Paraíba/Brasil. Desta forma, as etapas da pesquisa foram realizadas sem comprometimento de riscos ou danos aos participantes da pesquisa. Portanto, esta pesquisa experimental foi conduzida após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, com parecer substanciado e favorável (Apêndice I).

3.3 Aspectos éticos: Estudo *ex vivo*

Aos participantes da pesquisa foram garantidos os princípios de autonomia, beneficência, não-maleficência e justiça. A participação de cada integrante da pesquisa foi conduzida de forma voluntária, sendo garantido o direito de desistir, em qualquer momento, sem que essa decisão o prejudique. O Estudo de *ex vivo* foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CEP/CSS/UFPB). Aos indivíduos participantes deste estudo foram apresentados o Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLE), esclarecidos sobre os aspectos éticos do estudo. Mediante concordância com as condições do estudo, os voluntários realizaram assinatura ou impressão datiloscópica (APÊNDICE I).

3.4 Substância 2-Cloro-*N*-fenilacetamida (A1Cl) e antifúngico padrão

A molécula 2-cloro-*N*-fenilacetamida (A1Cl) foi sintetizada e cedida gentilmente pelo Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) vinculado ao Departamento de Química do Centro de Ciências de Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (CCEN/UFPB), sob supervisão do orientando de Pós-Doutorado Helivaldo Diógenes da Silva Souza e coordenação do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras deAthayde Filho. A molécula contém as seguintes especificações: rendimento $\geq 93\%$, pureza $\geq 97\%$, peso molecular 169,61 g/mol, pó opaco amorfo e ponto de fusão: 133-135 °C.

O fluconazol (2-(2,4-Difluorophenyl)-1,3-bis(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl) propan-2-ol) foi adquirido da Sigma-Aldrich®, com as seguintes especificações: rendimento $\geq 93\%$, pureza $\geq 98\%$, peso molecular 306,27, pó opaco amorfo.

Para realização dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica, os produtos foram pesados e solubilizados em Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich®) 150 µL (5%) e Tween 80 (Sigma-Aldrich®) 60 µL (2%). Em seguida foi completado o volume final com água destilada esterilizada com q.s.p de 3mL. Em seguida, foram feitas diluições de 1.024 para atingir 1 µg/mL usando meio RPMI 1640, para A1Cl e fluconazol e menores que 1 µg/mL para nistatina e caspofungina, duplamente concentrados (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) (CLEELAND; SQUARE, 1991.; SHOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

3.5 Linhagens do gênero *Candida*

As linhagens do gênero *Candida* foram adquiridas a partir do isolamento e identificação de material biológico isolados de fragmentos de unhas de pacientes com hipótese de diagnóstico para onicomicoses, atendidos no Laboratório de Patologia Clínica - HEMATO, localizado na cidade de João Pessoa-Paraíba/Brasil. Todos os dados foram cedidos pelo referido laboratório e após aprovação do Comitê de Ética as linhagens foram registardas no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético (SISGEN) sob o número A33D780 (ANEXO I e II).

Os seguintes isolados clínicos foram usados, *Candida albicans*: ATCC-76645, LM-03, LM-26, LM-44, LM-74, LM-123, LM- 157, LM-165, LM-175, LM-441, LM-600, LM-615, *Candida tropicalis*: ATCC-13803, LM-98, LM-111, LM-135 e *Candida parapsolosis*: ATCC-2209, LM-78, LM-197 e LM-707. Esses fungos pertencem à coleção de culturas fúngicas do Laboratório de Micologia (Universidade Federal da Paraíba, Brasil). Os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose (Difco®, Franklin Lakes, EUA) a 28 °C por 48 horas para obtenção do inóculo fúngico em solução salina estéril (0,85% NaCl). A turbidez do inóculo

final foi ajustada às escalas padrão McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) (CLSI 2017).

3.6 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para o isolamento dos isolados clínicos foram o meio sólido de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco®/USA/France) e Chormoagar - *Candida* (BioMérieux®/France). Para os ensaios de atividade antifúngica foi usado RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (Sigma- Aldrich®/Stenheim/Germany). Os produtos foram preparados conforme instruções do fabricante. Os meios foram solubilizados com água destilada esterilizadas em autoclave 121 °C por 15 minutos.

4.0 METODOLOGIA

4.1 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O potencial antifúngico de A1Cl e fluconazol (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) contra as cepas de *Candida* foram inicialmente analisados por meio da técnica de concentração inibitória mínima (CIM). Em uma microplaca de 96 poços (ALAMAR®) foram adicionados 100 µL de meio líquido RPMI - sem bicarbonato em todos os orifícios (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) (CLSI 2017) e 100 µL da emulsão das substâncias-testes nas primeiras linhas da microplaca, todos duplamente concentrados (CLSI 2017).

E por meio de uma diluição seriada à razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 a 1 µg/mL. E por fim, alíquotas de 10 µL das suspensões fúngicas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de causar inibição completa do crescimento fúngico após 48 h a 35 ± 2 °C. O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos 50% dos microrganismos utilizados nos ensaios de microdiluição (HAFIDH et al., 2011). E a CIM foi considerada ativa ou inativa, conforme critérios: até 600 µg/mL = forte atividade, 600-1500 = moderada atividade e ≥ 1500 = fraca atividade (HOUGHTON et al., 2007).

Após leitura e determinação da CIM foi realizado o ensaio para avaliação de CFM. Alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades com completa inibição do crescimento fúngico (CIM, 2xCIM e 4xCIM) foram retirados e semeados em novas placas contendo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram submetidas a incubação por 48 horas a 35 ± 2 °C. A CFM foi considerada como a menor concentração de A1Cl e fluconazol que inibiu em pelo menos 50% dos microrganismos utilizados nos ensaios biológicos (NCUBE;

AFOLAYAN, OKOH, 2008; BALOUIRI et al., 2016). O modo de ação de das substâncias testes por meio da razão CFM/CIM, conforme HAFIDH, 2011) com modificações. O efeito antifúngico foi considerado fungicida quando a razão CFM/CIM foi de 1:1 ou 2:1 e com proporção maior que 2:1, o efeito foi considerado fungistático.

Foram realizados controles de esterilidade, viabilidade celular e DMSO a 5% e Tween 80 a 2%. Ao término de todos os processos, as placas foram fechadas, seladas e incubadas em temperatura de 35 ± 2 °C no período de 48h, decorrido esse período foram realizadas as leituras dos ensaios biológicos.

4.2 Detecção de alterações micromorfológicas de *Candida*

Os efeitos de A1Cl e fluconazol nas alterações morfológicas de cepas de *C. albicans* (LM-441 e LM-600), *C. tropicalis* (LM-98 e LM-111) e *C. parapsilosis* (LM- 78 e LM-197) foram avaliados por meio da técnica de cultivo em lâmina com o meio ágar fubá sólido com Tween 80 a 2% (CA, HiMediaLaboratories, Mumbia, Índia) (ALVES et al. 2013).

Alíquotas de 3mL de ágar fubá incorporados com 100 µL das substâncias (CIM, 2xCIM e 4xCIM) foram depositadas sob lâminas esterizadas apoiadas sobre um suporte contido em placa de Petri. Após solidificação do meio, inóculos das culturas de *Candida* foram semeados, com auxílio de uma alça bacteriológica esterelizada, em duas estrias paralelas e cobertas com lamínulas de vidro placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48h em câmara úmida. Também realizamos testes de controle sem drogas. Decorrido o período de incubação, as preparações foram examinadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci®, Tóquio, Japão) em 400x e observadas ocorrências ou não de alterações de estruturas como hifas, pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios com observação em cinco campos distintos. Os scores de intensidade de produção foram alto (+++), moderado (++) ,baixo (+) e ausente (-), comparando os resultados obtidos nos experimentos aos respectivos controlesn (PEREIRA et al., 2015).

4.3 Ensaios de atividade antifúngica sobre a parede celular

4.3.1 Ensaios com o sorbitol

Para determinação da CIM dos produtos na ausência e na presença do sorbitol foi utilizada a técnica de microdiluição, em meio RPMI-1640 em microplacas de 96 poços (Zacchino 2001). Em cada poço de microplacas (ALAMAR®) distintas foram pipetadas alíquotas de 100 µL do meio líquido RPMI-1640 na ausência e na presença de sorbitol com concentração de 0,8 mol/L, ambos duplamente concentrado.

Em seguida, 100 μL de A1Cl e caspofungina, também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da microplaca e por meio de uma diluição seriada a razão de dois foram obtidas concentrações de 4 $\mu\text{g/mL}$ até 0,0002 $\mu\text{g/mL}$ (ausência do sorbitol) e 64 $\mu\text{g/mL}$ até 0,031 $\mu\text{g/mL}$ (na presença do sorbitol) para caspofungina. Para A1Cl foram obtidas concentrações de 4.096 $\mu\text{g/mL}$ até 2 $\mu\text{g/mL}$ (na ausência e presença do sorbitol). Por fim, foram adicionados 10 μL do inóculo de modo que cada coluna da placa correspondeu uma espécie fúngica.

Foram realizados controles de esterilidade, viabilidade celular e DMSO a 5% e Tween 80 a 2% e com o antifúngico padrão (caspofungina). Ao término de todos os processos, as placas foram fechadas, seladas e incubadas em temperatura de $35\pm 2^\circ\text{C}$ no período de 48h, decorrido esse período foram realizadas as leituras dos ensaios biológicos.

4.4 Ensaios de atividade antifúngica sobre a membrana plasmática

4.4.1 Ensaio com o ergosterol

Para determinação da CIM dos produtos na ausência e na presença do ergosterol foi utilizada a técnica de microdiluição, em meio RPMI-1640 utilizando microplacas de 96 poços (Escalante et al., 2008). Em cada poço de microplacas (ALAMAR[®]) distintas foram pipetadas alíquotas de 100 μL do meio líquido RPMI-1640 na ausência e na presença de ergosterol com concentração de 400 μg , ambos duplamente concentrado.

Em seguida, 100 μL de A1Cl e anfotericina B, também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da microplaca e por meio de uma diluição seriada a razão de dois foram obtidas concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ até 0,0031 $\mu\text{g/mL}$ (ausência e presença do ergosterol) para avaliação da anfotericina B e 4.096 $\mu\text{g/mL}$ até 8 $\mu\text{g/mL}$ (ausência e presença do ergosterol), para A1Cl. Por fim, foram adicionados 10 μL do inóculo nas cavidades, em que cada coluna da placa correspondeu uma espécie fúngica.

Foram testados controles de esterilidade, viabilidade celular e DMSO a 5% e Tween 80 a 2% e com o antifúngico padrão (anfotericina B). Ao término de todos os processos, as placas foram fechadas, seladas e incubadas em temperatura de $35\pm 2^\circ\text{C}$ no período de 48h, decorrido esse período foram realizadas as leituras dos ensaios biológicos.

4.5 Estudos de associação

4.5.1 Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Método de *Checkerboard*) de 2-cloro-N-Fenilacetamida associado com antifúngico padrão.

O efeito da associação de A1Cl com o fluconazol foi analisado pela técnica *checkerboard* (LEWIS et al., 2002). Inicialmente, foram preparadas diluições das soluções de drogas de teste em 1/8 CIM, 1/4 CIM, 1/2 CIM, CIM, 2×CIM 4xMIC e 8×CIM em RPMI 1640. Uma alíquota de 50 µl de A1Cl foi então adicionada aos poços da placa em uma vertical sentido, e 50 µl de uma diluição específica de fluconazol foram adicionados na direção horizontal da placa. Finalmente, 100 µl de inóculo foi adicionado. As placas foram seladas e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h para leituras. O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado como a soma de: $\text{CIF}_A + \text{CIF}_B$, onde A representa A1Cl, B representa fluconazol. O $\text{CIF}_A = (\text{CIM}_A \text{ combinado})/(\text{CIM}_A \text{ sozinho})$, enquanto o $\text{CIF}_B = (\text{CIM}_B \text{ combinado})/(\text{sozinho CIM}_B)$. O FICI foi interpretado da seguinte forma maneira: sinergismo ($<0,5$), aditividade (0,5–1,0), indiferença ($>1,0$ e $<4,0$) ou antagonismo ($>4,0$) (LEWIS et al., 2002).

Foram testados controles de esterilidade, viabilidade celular e DMSO a 5% e Tween 80 a 2% e com o antifúngico padrão. Ao término de todos os processos, as placas foram fechadas, seladas e incubadas em temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ no período de 48h, decorrido esse período foram realizadas as leituras dos ensaios biológicos.

4.6 Teste de sensibilidade de biofilmes em modelos *in vitro*

4.6.1 Efeitos de inibição da formação de biofilme

Este modelo experimental foi realizado conforme metodologia descrita por BALASUBRAMANIAN et al. (2012), com modificações. Inicialmente foram pipetadas alíquotas de 100µL de meio RPMI contendo diferentes concentrações das substâncias testes (4/CIM, 2/CIM, CIM, 2xCIM, 4xCIM) e 10µL do inóculo que apresentaram os melhores resultados no modelo de CIM. Decorridos 48h de incubação estática a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, os conteúdos dos poços foram descartados e delicadamente lavados com água destilada estéril com o objetivo de remover qualquer crescimento planctônico (células não aderidas), reservando-os para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, foram transferidos 140µL de solução de cristal violeta a 1% (NEWPROV®) e acondicionados em repouso absoluto por 40 min.

Em seguida, o corante foi descartado e seu excesso aderido as paredes dos poços foram removidos lavando-se com água destilada estéril. Por fim, todos os poços secos, receberam 140µL de etanol absoluto (RIOQUÍMICA®) e, após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO) à 590nm.

4.6.2 Efeito de ruptura de biofilme pré-formado

Para avaliar a capacidade de A1Cl romper o biofilme já formado, foi realizada a metodologia descrita por RAJASEKHARAN et al. (2017), com modificações.

Inicialmente foram pipetadas alíquotas de 100 µL de meio RPMI e 10µL dos inóculos que apresentaram os melhores resultados no modelo de CIM. Em seguida, permaneceram sob incubação estática entre 48h/72h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ para formação do biofilme. Decorrido esse tempo, os conteúdos dos poços foram descartados e foram adicionados novamente alíquotas de 100µL de meio RPMI, com diferentes concentrações da substância teste (CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8), os quais foram incubados novamente durante 48h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, de forma estática. Nos poços correspondentes ao controle negativo foram pipetados apenas meio de cultura e inóculo.

Lopo após, foi realizada a mesma metodologia descrita anteriormente para coloração do biofilme com cristal violeta a 1% e solubilização em etanol absoluto, seguida de leitura em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO) à 590 nm. A significância estatística foi determinada por testes de pares usando o teste t-student não pareado e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. A porcentagem de ruptura do biofilme pré-formado foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % de ruptura do biofilme = $[(\text{ABS}_{590} \text{ controle} - \text{ABS}_{590} \text{ teste}) / \text{ABS}_{590} \text{ controle}] \times 100$ (RAJASEKHARAN et al., 2017).

4.7 Teste de sensibilidade de biofilmes em modelos *ex vivo*

4.7.1 Aquisição de material biológico

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Saúde do Centro de Ciências da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil) sob o código SISGEN 4.120.514. Os fragmentos de unhas foram obtidos de vinte voluntários do gênero masculino e feminino, maiores de 18 anos, sem presença de lesões aparentes, esmaltes em unhas e ausentes de terapia antimicrobiana em um período de 15 dias. Em seguida, foi realizada remoção de toda a sujeira e detritos para remover qualquer contaminantes de superfície que poderia influenciar as análises testes, cortados em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, tratado com etanol por 15 min, seco a 28°C e finalmente autoclavado (1 atm, 121°C , 15 min) e mantidos em tubos selados à temperatura ambiente. Foram realizados os testes de capacidade de crescimento de todos os microrganismos sobre os fragmentos ungueais de cada voluntário para validação do modelo experimental e não foram observadas diferenças nas taxas

de crescimento dos inóculos de *Candida* entre os fragmentos ungueais. Portanto, a escolha dos fragmentos para os ensaios foi realizada independente de sua origem clínica.

4.7.2 Modelo de biofilme *ex vivo*

Esse modelo experimental foi realizado conforme Vila et al (2015a), Vila et al (2015b) com modificações. Em uma microplaca de fundo chato de 96 poços (TPP Techno PlasticProducts AG®, Suíça) foram depositadas fragmentos de unhas humanas esterilizadas (2mm x 2mm). De modo que alíquotas de 100 µL de suspensões celulares (10^7 UFC/mL) foram transferidas para cada poço e incubadas por 3 h a 35 ± 2 °C (fase de adesão).

Ao término, as suspensões celulares foram aspiradas suavemente, e em seguida, alíquotas de 100 µL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., EUA) suplementados com 2% de glicose e 20% de bovinos fetais soro (FBS) (Gibco®, EUA) foram adicionados a cada poço para permitir o crescimento de biofilme ao longo da superfície das unhas (Vila et al., 2014). Após esse procedimento foram realizadas duas etapas:

I - imediatamente após a fase de adesão e pipetagem do meio de crescimento foram pipetadas alíquotas de 100 µL da substâncias teste em suas respectivas concentrações e incubadas sob temperatura de 35 ± 2 °C/48 h (verificação da capacidade da substância teste inibir a formação de biofilme).

II - Nessa segunda etapa, as placas foram incubadas sob temperatura de 35 ± 2 °C/48h, para favorecer a formação de biofilme em unhas. Decorrido esse tempo, foram adicionados alíquotas de 100 µL da substância teste em suas respectivas concentrações e incubadas sob temperatura de 35 ± 2 °C/48 h. (verificação da capacidade das substâncias romper o biofilme pré-formado).

Em seguida, todas as alíquotas foram aspiradas delicadamente e desprezadas, ao passo, foram adicionadas 100 µL de água destilada estéril e realizada agitação para desprender o biofilme formado em unhas, retirado 10 µL do sobranadante de cada poço e realizado diluição (1:100), para cada concentração avaliada. Por fim, 10 µL da suspensão foram semeados em placas com ASD estéril e submetidos a incubação por 35 ± 2 °C/48h. Todas as análises foram realizados em quintuplicata e expressos em UFC/mL ($\times 10^5$).

4.8 Modelos *in silico*

4.8.1 *Docking* Molecular

Inicialmente, a estrutura química do AlCl foi construída no MarvinSketch

(ChemAxon), e a estrutura do fluconazol foi obtida do banco de dados de estruturas químicas PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Em seguida, foram agrupados em um único arquivo SDF criado pelo Software ChemAxon[®] Standardizer18.21.0 (ChemAxon). Foram selecionados os alvos celulares com base no potencial biológico e arranjo estrutural, como a largura da fenda do sítio ativo significativamente maior que a da enzima humana que fornece a base para a concepção potencialmente seletiva inibidores (MARC et al., 1997).

Para isso, obtivemos estruturas 3D das enzimas Dihidrofolato reductase (DHFR) (Protein Data Bank ID: 1M79), Geranilgeraniltransferase-I (GGTase-I) (Protein Data Bank ID: 1MZC) e Protease aspártica-2 (SAP-2) (Protein Data Bank ID: 3PVK), cristalizados a partir de espécies de *Candida* (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEIN et al., 1977).

As estruturas tridimensionais com alvos moleculares em formato PDB e seus ligantes foram submetidos as predições moleculares usando o software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (Molexus) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O ligante complexado da estrutura enzimática foi complexado ao medicamento padrão para delinear o sítio ativo e comparar os resultados de energia de ligação com o A1Cl. De modo que, o número de simulações específicas é o número de vezes em que a simulação de acoplamento é repetida para cada ligante.

Um grid de acoplamento também foi gerado, com resolução de 0,8 Å abrangendo toda a estrutura da proteína com uma esfera de raio 1,4 Å em cada ponto da grade e verificamos se estas esferas se sobreporia a qualquer uma das esferas determinadas pelo Van der Waals raios dos átomos de proteína. Também, utilizamos o algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) com os seguintes parâmetros: 10 execuções com máxima 1500 interações em 50 indivíduos, 2000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas globais de minimização por execução. Assim, o MolDock Score (GRID) foi usado para calcular os valores de energia instantânea (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Um GRID foi definido em 0,3 Å, e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio internas.

4.8.2 Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para estimar a flexibilidade e mudanças conformacionais em estruturas tridimensionais de Dihidrofolato reductase (DHFR), Geranilgeraniltransferase-I (GGTase-I) e Protease aspártica-2 (SAP-2) com os ligantes usando o software GROMACS 5.0 (ABRAHAM et al., 2015) e com topologia usando o campo de força GROMOS96. Inicialmente o sistema foi neutralizado pela adição de íons (Cl^- e Na^+) e minimizado para remover maus contatos entre moléculas complexas e solvente. O sistema

também foi balanceado em 300K usando o algoritmo V-rescale em 100ps representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por equilíbrio a 1 atm de pressão usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (partículas numéricas constantes, pressão e temperatura) até 100ps.

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas em 5.000.000 etapas a 10ns. Além do mais, para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo seria estável em proximidade dos alvos, o deslocamento médio da raiz quadrada (RMSD) de todos os átomos de Ca foi calculado em relação às estruturas de partida. Flutuações residuais (RMSF) também foram analisadas para entender o papel dos resíduos próximos ao local de ligação do receptor. Os gráficos de RMSD e RMSF foram gerados no software Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores CIM e CFM foram expressos como valores modais dos resultados (triplicata). Os ensaios *in vitro* e *ex vivo* foram realizados em quintuplicata e expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, utilizando o software GraphPadPrism (versão 6.0 para Windows, San Diego, CA, EUA). O nível designificância mínimo permitido foi quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os resultados dos ensaios para avaliação da atividade antifúngica da molécula A1Cl e do fluconazol sobre espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* estão expressos na Tabela 1. Os valores de CIM e CFM para A1Cl em que foi observado inibição de crescimento $\geq 50\%$ foi 128 $\mu\text{g/mL}$ e para fluconazol 512 $\mu\text{g/mL}$

Além disso, o crescimento fúngico foi detectado quando todas as cepas foram semeadas na ausência de drogas (viabilidade do inóculo), enquanto DMSO 5% a Tween 80 2% não inibiu o crescimento de fungos.

Com base nesses resultados é possível inferir que A1Cl reduziu o crescimento fúngico, por meio de efeitos fungicidas nas condições avaliadas. Baseado nos resultados obtidos nos modelos experimentais de CIM e CFM foram selecionados dois isolados clínicos de cada espécie fúngica, considerando a melhor média de inibição de crescimento para serem utilizados nos estudos de investigação de alterações morfológicas pela técnica de microcultivo, mecanismos de ação e efeitos antibiofilmes: *C. albicans* (LM-441 e LM-600), *C. tropicalis* (LM-98 e LM-111) e *C. parapsilosis* (LM- 78 e LM-197).

Tabela 1: Resultados dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de A1Cl e fluconazol contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*

Fungos	A1Cl			Fluconazol		
	CIM*	CFM*	CFM/CIM	CIM*	CFM*	CFM/CIM
<i>Candida albicans</i>						
ATCC-76645	8	8	Fungicida	8	16	Fungicida
LM-03	128	128	Fungicida	512	512	Fungicida
LM-26	128	128	Fungistático	512	512	Fungicida
LM-44	256	256	Fungicida	512	512	Fungicida
LM-74	128	128	Fungicida	256	256	Fungicida
LM-123	128	128	Fungicida	256	512	Fungicida
LM-157	128	256	Fungicida	256	512	Fungicida
LM-165	128	128	Fungicida	512	512	Fungicida
LM-175	256	256	Fungicida	512	512	Fungicida
LM-441	128	128	Fungicida	256	512	Fungicida
LM-600	128	128	Fungistático	256	512	Fungicida
LM-615	128	512	Fungistático	512	512	Fungicida
<i>C. tropicalis</i>						
ATCC -13803	8	16	Fungistático	8	8	Fungicida
LM-98	128	128	Fungicida	256	256	Fungicida
LM-111	128	128	Fungicida	512	512	Fungicida
LM-135	512	512	Fungicida	512	512	Fungicida
<i>C. parapsilosis</i>						
ATCC- 22019	16	16	Fungicida	8	16	Fungicida
LM-78	128	128	Fungicida	128	256	Fungicida
LM-197	256	256	Fungicida	512	512	Fungicida
LM-707	256	512	Fungicida	512	512	Fungicida

*CIM-Concentração Inibitória Mínima, *CFM-Concentração Fungicida Mínimo. Valores Modais de três experimentos.

Desde o início do século XVII a pesquisa científica para geração de moléculas sintéticas bioativas, mobilizou ao longo de décadas o interesse dos grandes laboratórios de química e da indústria farmacêutica, o que fascinou os cientistas devido à capacidade de sintetizar protótipos candidatos a novos fármacos mais eficazes e seguros, com alto rendimento e baixo custo. Nesse contexto, a busca pelo desenvolvimento e inserção de estruturas muito complexas de maneira eficiente, rápida e segura e em menos etapas nos processos de síntese orgânica é um desafio contínuo em diversos centros de pesquisas (DE SOUZA et al., 2017).

Estima-se que na farmacoterapia moderna 50%-70% de todos os fármacos desenvolvidos foram baseados em estruturas de análogos semi-sintéticos e/ou sintéticos, derivados dos produtos naturais (PYE et al., 2016). Todavia, a metodologia sintética ainda limita a obtenção de compostos bioativos que os químicos medicinais podem projetar experimentalmente, em virtude de sua complexidade estrutural e grau de pureza.

A síntese orgânica certamente não é um problema resolvido, pois muitos desafios significativos permanecem. Além disso, a síntese experimental representa o aspecto mais demorado da química medicinal. Desta forma, melhorias nos processos de síntese, obtenção e purificação de moléculas, associados aos estudos *in silico*, tem grande potencial para aumentar a eficiência e reduzir o custo de obtenção de novas moléculas. Proporcionando potencial retorno científico e financeiro dos investimentos realizados em centros de pesquisas em síntese orgânica (BLAKEMORE et al., 2018).

Além do mais, a indústria farmacêutica, caracterizada como o maior potencial econômico da bioprospecção, seja associado à descoberta de um novo fármaco que provenha diretamente da biodiversidade ou principalmente obtidos por processos de síntese a partir dos recursos genéticos ou bioquímicos (MONTANARI; BOLZANI, 2001; ATANASOV, 2015) tem ressurgido na tentativa de prospecção por alternativas terapêuticas antifúngicas com eficácia semelhante ou superior às observadas para os fármacos disponíveis em prática clínica que sejam mais seguros e menos tóxicos. Desta forma, o desenvolvimento de novos medicamentos ampliará o arsenal terapêutico disponível à população com a descoberta de novos agentes terapêuticos com diferentes mecanismos de ação, o que permite ampliar o espectro de ação contra microrganismos resistentes (ALVES et al., 2021).

Em geral, os estudos científicos voltados para a síntese de novos antifúngicos avaliam os efeitos biológicos de moléculas por meio de diferentes protocolos experimentais, que incluem estudos iniciais para determinar suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) em testes de microdiluição em caldo (ALVES et al., 2021). Muitas vezes, esses protocolos são

modificados em relação às concentrações celulares, ao tipo de meio de cultura e aos microrganismos utilizados.

Relatos em literatura, afirmam que infecções ocasionadas por *Candida*, são consideradas uma preocupação crescente de saúde pública global, agravada pelo rápido surgimento de resistência antifúngica e, em muitos cenários, com acesso limitado aos diagnósticos de qualidade e tratamento. Geralmente leva a terapia prolongada e uma necessidade crescente de utilização de medicamentos antifúngicos de segunda geração, caros e tóxicos. Esses fármacos geralmente não estão disponíveis e podem contribuir para o agravamento e reincidência de infecções (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2022), especialmente em onicomicoses.

Além do mais, quando comparado com a pesquisa antibacteriana, pouco progresso tem sido feito no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, que tem sido justificado pela estreita relação evolutiva com hospedeiros humanos e pela baixa ocorrência de estudos em infecções fúngicas (SCORZONI et al., 2017).

Portanto, há uma necessidade urgente de mais estudos de prospecção de atividade antifúngica, para melhor compreensão e efeitos de substâncias sintéticas contra os patógenos emergentes.

O protocolo de referência para a técnica de microdiluição e determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica (M7-A3) é descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2017). Considerada simples, econômica e reprodutível, requer uma pequena quantidade de amostras variadas a ser trabalhada para um maior número de repetições. Pode ser aplicada para substâncias naturais, semissintéticas e/ou sintéticas, solúveis e lipossolúveis, dispondo de resultados quantitativos com sensibilidade de trinta vezes maior do que os demais métodos descritos em literatura. Além disso, este método tem ainda a vantagem em disponibilizar informações sobre a Concentração Fungicida Mínima - CFM (CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; HADACEK, GREGER, 2000; OSTROSKY et al., 2008).

Frequentemente, os pesquisadores classificam o potencial antifúngico de novos compostos com base em uma análise empírica dos resultados obtidos para CIMs. Diretrizes disponíveis propostas pelo CLSI e pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) oferecem parâmetros para a classificação de substâncias destinadas ao uso em prática clínica. Todavia, devem ser estabelecidos pontos de corte que possam ser aplicados na busca de novas moléculas com potencial para avaliações clínicas *in vivo* e no aprimoramento da substância para atingir seu melhor perfil biológico, na triagem

antimicrobiana (ALVES et al., 2021).

Além do mais, esses métodos de teste de suscetibilidade antifúngica estão disponíveis para detectar resistência antifúngica e determinar o melhor tratamento para um fungo específico. A microbiologia clínica depende desses métodos para selecionar o agente de escolha para uma infecção fúngica e conhecer a epidemiologia local e global da resistência aos antifúngicos (WIEDERHOLD, 2021).

Nesse contexto, diante dos resultados obtidos pode-se observar que A1Cl apresentou forte atividade antifúngica inibindo o crescimento dos isolados clínicos em mais 50% dos microrganismos avaliados nas concentrações de 128 µg/mL (Tabela 1).

Os resultados da atividade antifúngica do composto avaliado sugerem que *N*-fenil e a presença do átomo de cloro está diretamente relacionado com a potência da atividade antifúngica observada, pois corroboram com os estudos realizados por Akolkar et al., (2020) em que novos derivados *N*-fenilacetamida ligado a 1,2,3-triazol com conjugados cumarínicos apresentaram ampla atividade de inibição fúngica frente cepas *C. albicans*. E que introdução de átomos de cloro em posição para do anel *N*-fenil de derivados acetamidas potencializou a atividade antimicrobiana contra isolados clínicos de *S. aureus* (SOYER; ERAÇ, 2007).

Parmar et al., (2015), demonstraram que moléculas com novas estruturas 2-Cloro-*N*-(Aril) acetamidas foram avaliados e demonstraram atividades promissoras quanto à sua atividade *in vitro* antibacteriana e anti-fúngica.

Como não há um consenso bem estabelecido sobre a potência e natureza da atividade inibitória de novos produtos, a classificação exata sobre a eficácia da atividade inibitória demonstrada por uma substância com escassos resultados, torna-se difícil.

Para os azóis contra leveduras, a CIM é lida na concentração mais baixa que resulta em uma inibição de crescimento de 50% em comparação com o poço de controle de crescimento, com interpretações que classifiquem um organismo como suscetível ou resistente. No entanto, tais interpretações só podem ser fornecidas se um ponto de interrupção clínico tiver sido estabelecido. Um ponto de interrupção clínico é um valor de CIM limite, abaixo do qual um determinado organismo é considerado suscetível ao medicamento que está sendo testado e acima do qual o organismo é considerado resistente (WIEDERHOLD, 2021).

Desta forma, podemos considerar que o surgimento e desenvolvimento de resistência aos medicamentos antifúngicos têm sérias preocupações em termos de falhas terapêuticas, relacionadas principalmente à resistência a medicamentos azóis, o que se torna emergente a busca por moléculas biotivas. Pode-se observar que todos as espécies fúngicas demonstraram valores de CIM ≥ 8 µg/mL (CLSI, 2017) e CIM ≥ 4 µg/mL (EUCAST, 2017), caracterizando

uma forte resistência ao fluconazol.

Conforme Ahangarkani et al., (2019) a resistência ao fluconazol surgiu entre as espécies de *Candida* desde o início de sua inserção nas práticas clínicas, como resultado da pressão seletiva causada pela profilaxia, manejo terapêutico e uso irracional o que pode ser evidenciado para os isolados clínicos da presente pesquisa.

Relatos em literatura, mostram que os mecanismos mais prevalentes que conferem proteção contra azóis em leveduras envolvem mutações de ganho de função em *PDR1*, que codifica um regulador transcricional de bombas de efluxo de drogas. Sob condições de estresse, os mecanismos de manutenção e reparo do genoma são alterados, o que pode levar ao aparecimento de fenótipos de resistência (KSIEZOPOLSKA et al., 2021). Além disso, codificações pelo gene *ERG11*, altera a natureza da enzima, lanosterol 14- α demetilase (*CYP51*) e consequentemente altera a ação inibitória dos azóis, levando à resistência (ODIBA et al., 2022).

Os mecanismos que contribuem para a diminuição da suscetibilidade de *Candida* nos biofilmes às drogas antifúngicas são diferentes daquelas das células planctônicas. Como resultado, o principal mecanismo que leva à resistência dos biofilmes de *Candida* ao fluconazol, é uma diminuição da exposição das células do biofilme ao próprio fármaco, conforme evidenciado pela descoberta de que células mais resistentes que falham em gerar matriz extracelular associada ao biofilme permanecem suscetíveis ao fluconazol. Portanto, a exposição de biofilmes a uma determinada concentração da droga resulta em uma concentração intracelular muito menor da droga (BERMAN; KRYSAN, 2020) favorecendo recidivas e severidade de onicomicoses.

Os ensaios de avaliação de atividade biológica *in vitro* para determinação de CFM são úteis para determinar o possível perfil terapêutico antifúngico em indivíduos saudáveis fundamentando-se na concentração necessária, que é alcançada no sítio de infecção, para atuar como um potencial inibidor crescimento de microrganismos.

Todavia, para pacientes com sistema imunológico comprometido a CFM é mais eficaz para orientação em terapia antifúngica (KONEMAN et al., 1993). De modo que a atividade fungicida é clinicamente mais importante do que a atividade fungistática, porque o uso profilático de drogas fungistáticas têm sido associada a um aumento da frequência de resistência inata ou adquirida em isolados clínicos (MONK, GOFFEAU, 2008), conferindo a molécula A1Cl uma potencial ferramenta terapêutica para a prevenção, remissão e/ou cura de pacientes acometidos por onicomicoses.

De acordo com Siddiqui et al., (2013), uma substância teste com atividade antifúngica pode ter um efeito fungistático ou fungicida, se calcularmos a razão entre CFM/CIM de modo a inferir o seu efeito antifúngico. Desta forma, caso a razão resulte em um valor ≤ 4 o efeito é fungicida, todavia se for ≥ 4 o produto teste tem efeito fungistático. Com base nos resultados observados a molécula sintética A1Cl possui efeito fungicida, já que a maior proporção da razão obtida entre CFM/CIM foi de ≤ 4 para 80% microrganismos no modelo avaliado.

Para o fluconazol, os valores de CIMs foram altos, enquanto CFMs eram relativamente alto. De modo que as relações CFM/CIM para todos organismos foram extremamente baixos, indicando que fluconazol é fungicida em vez de fungicida no modelo avaliado para esses microrganismos comumente envolvidos em onicomicoses.

Sob condições padronizadas do NCCLS, o fluconazol demonstra inibição *in vitro* de microrganismos de espécies de *Candida* sp, sendo considerado apenas fungistático. Com efeitos estritamente definidos, exigindo uma baixa densidade inicial de células e meios altamente tamponados em pH neutro (MOOSA et al., 2004). Embora azóis, apresentem efeitos fungistáticos, alguns fármacos, são fungicidas sob certas condições, como em alta concentração ou contra cepas específicas. Na última década, diversos estudos investigaram se o fluconazol pode ter um efeito fungicida. Lee et al., 2018 afirmam que o fluconazol possui atividade fungicida através de respostas apoptóticas dependentes de concentração em *Candida albicans*.

Estudos em literatura relatam que vários fatores podem contribuir para essas diferenças no potencial antimicrobiano, como: diferenças nas técnicas analíticas (ZAIKA, 1988; MANN, MARKHAM, 1998), diferentes meios de cultura utilizados nos testes, diferença de volatilidade e solubilidade, associados aos métodos que dependem da difusão ou diluição da substância em um meio microbiológico (DELAQUIS et al., 2002).

A ocorrência de moléculas amidas não é comum em plantas, mas pesquisas têm buscado a síntese aplicada dessas estruturas, que apresentam importantes atividades biológicas, como uma alta atividade antimicrobiana inibitória, e foi comprovado que os análogos clorados possuem maior inibição microbiana em cepas fúngicas do que seus análogos fluorados e bromados (PEREZ-CASTILLO et al., 2021).

Efeito comparativo, também foi evidenciado por Liu et al. (2019), de modo que compostos sintéticos que possuem átomos de cloro em sua estrutura são mais potentes para efeito fungicida quando comparados a compostos que tinham átomos de bromo e iodo.

Esses resultados corroboram com os estudos desenvolvidos por Oliveira (2016) em que por meio de análises comparativas de estruturas químicas de amidas resultaram em aumento

da potência fungicida, sendo quatro vezes mais potente para a maioria dos isolados avaliados, quando comparados as estruturas sem a presença de amidas.

Portanto, baseado nos resultados promissores obtidos nesses modelos de suscetibilidade fúngica, motivou pesquisa a investigar a atividade antifúngica da molécula (A1Cl) no modelo de alterações em micromorfologia fúngica.

6.2 Detecção de alterações micromorfológicas de *Candida* pela técnica de microcultivo

No ensaio de micromorfologia fúngica de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C.parapsilosis* foi analisada a presença de estruturas características do crescimento fúngico: hifas, pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios na presença e ausência de drogas.

No controle de crescimento pode-se notar a presença abundante de blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios (Figuras de 11 a 13). Entretanto na presença de A1Cl foi observado em sua maioria células isoladas, raras pseudo-hifas e blastoconídios. Quando avaliados na presença do fluconazol foram visualizadas células isoladas e raros blastoconídios. (Figura 11 a 13).

Portanto, é possível inferir que ambos os compostos avaliados reduziram de modo significativo as estruturas fúngicas importantes estruturas de virulência associadas as onicomicoses quando testados nas concentrações de 4xCIM, 2xCIM e CIM comparados aos respectivos controles, com efeito dependente de concentração (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado de alterações micromorfológicas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na presença de AICI e fluconazol.

Produtos (µg/mL)		<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. parapsilosis</i>		
		ATCC-76645	LM-441	LM-600	ATCC-13803	LM-98	LM-111	ATCC-22019	LM-78	LM-197
AICI	CIM	++	++	++	++	+++	++	++	++	++
	CIMx2	+	+	++	++	++	+	++	++	++
	CIMx4	+	+	+	++	+	+	+	+	++
Fluconazol	CIM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	CIMx2	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++
	CIMx4	+	++	++	+	++	++	++	+	+

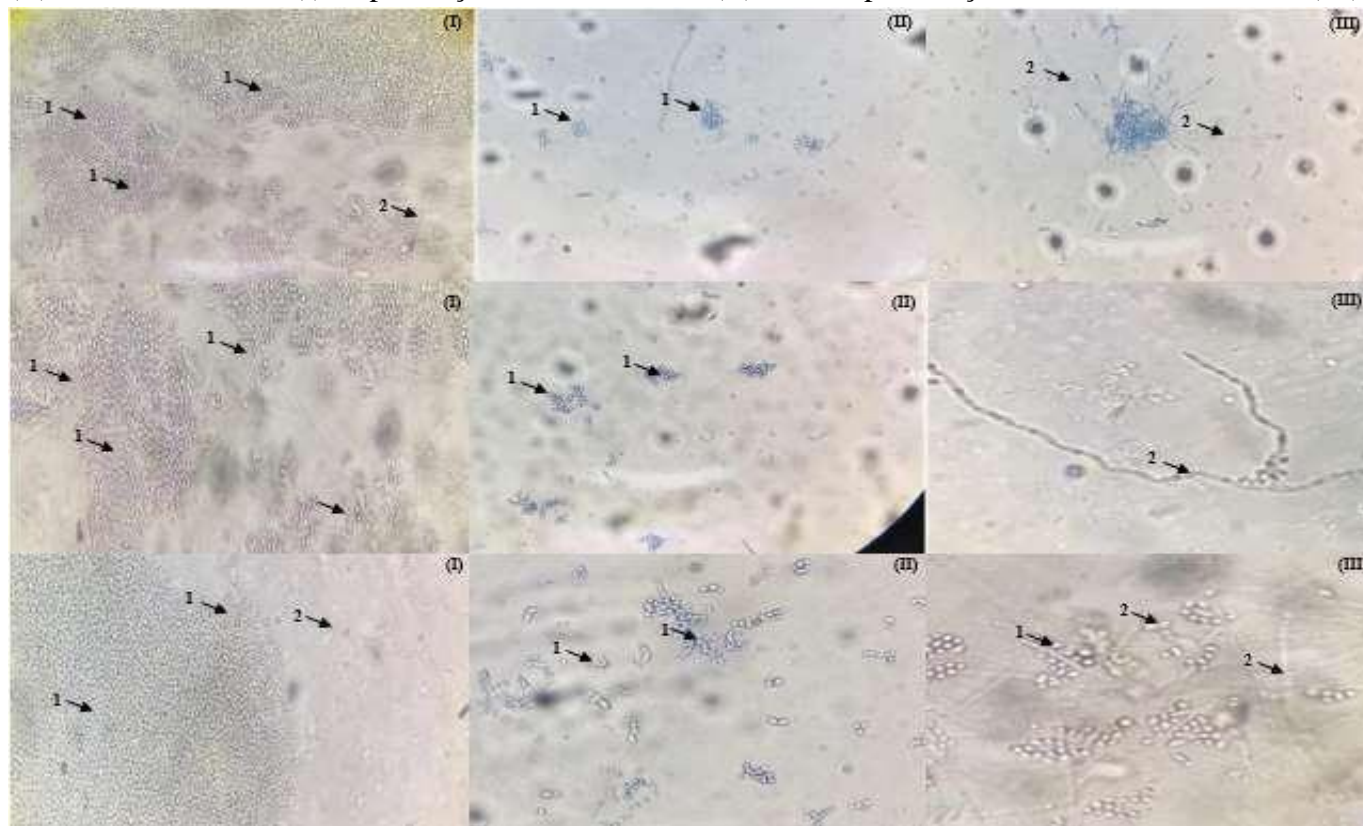
Determinação de resultados, por meio de scores:

≥ +++ Presença de hifas, pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios.

≤ ++ Redução de hifas, pseudo-hifas e clamidoconídios.

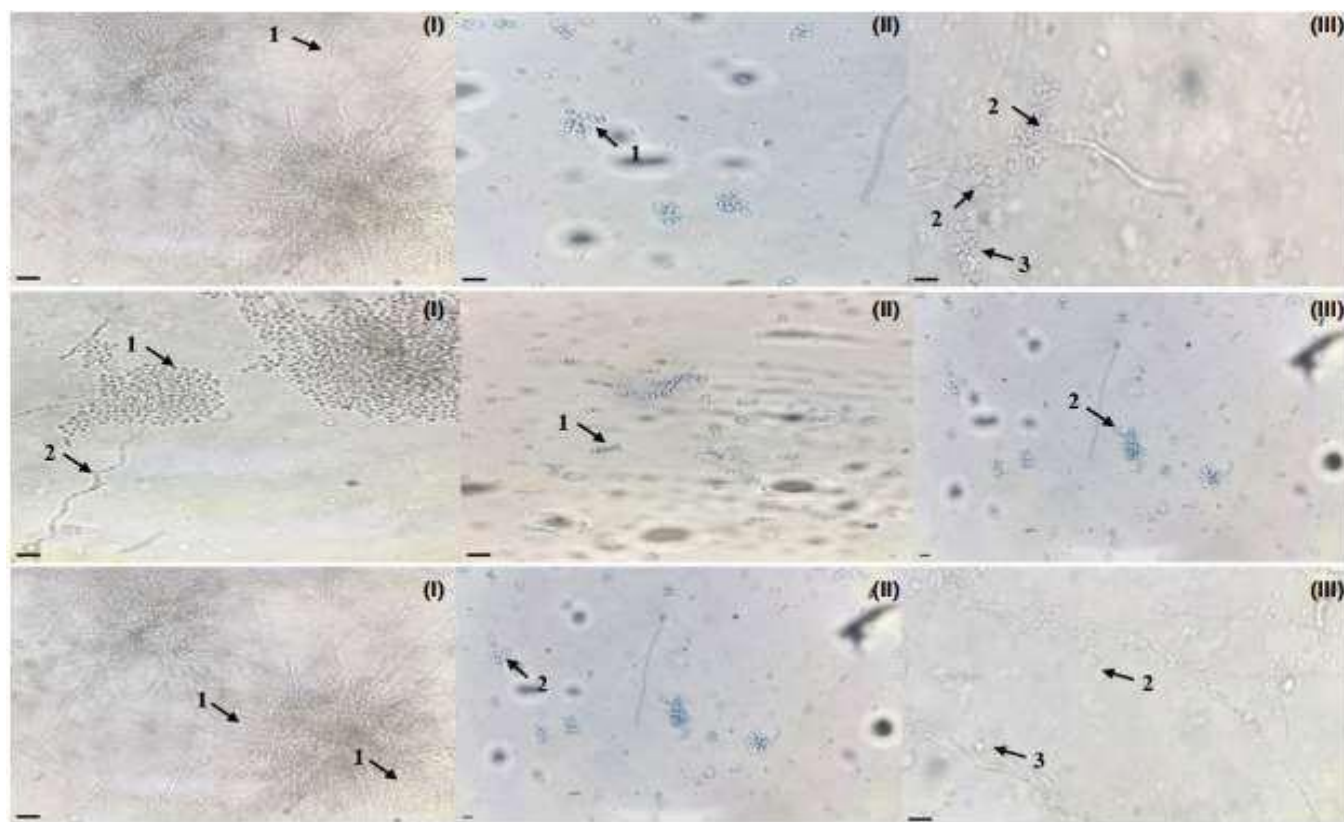
+ Raras hifas, blastoconídios e ausência de pseudo-hifas.

Figura 11: Análise de micromorfologia de *Candida albicans* ATCC-76645 (A), LM-441 (B) e LM-600 (C) ausência (I) presença de A1Cl (II) e presença de fluconazol (III).



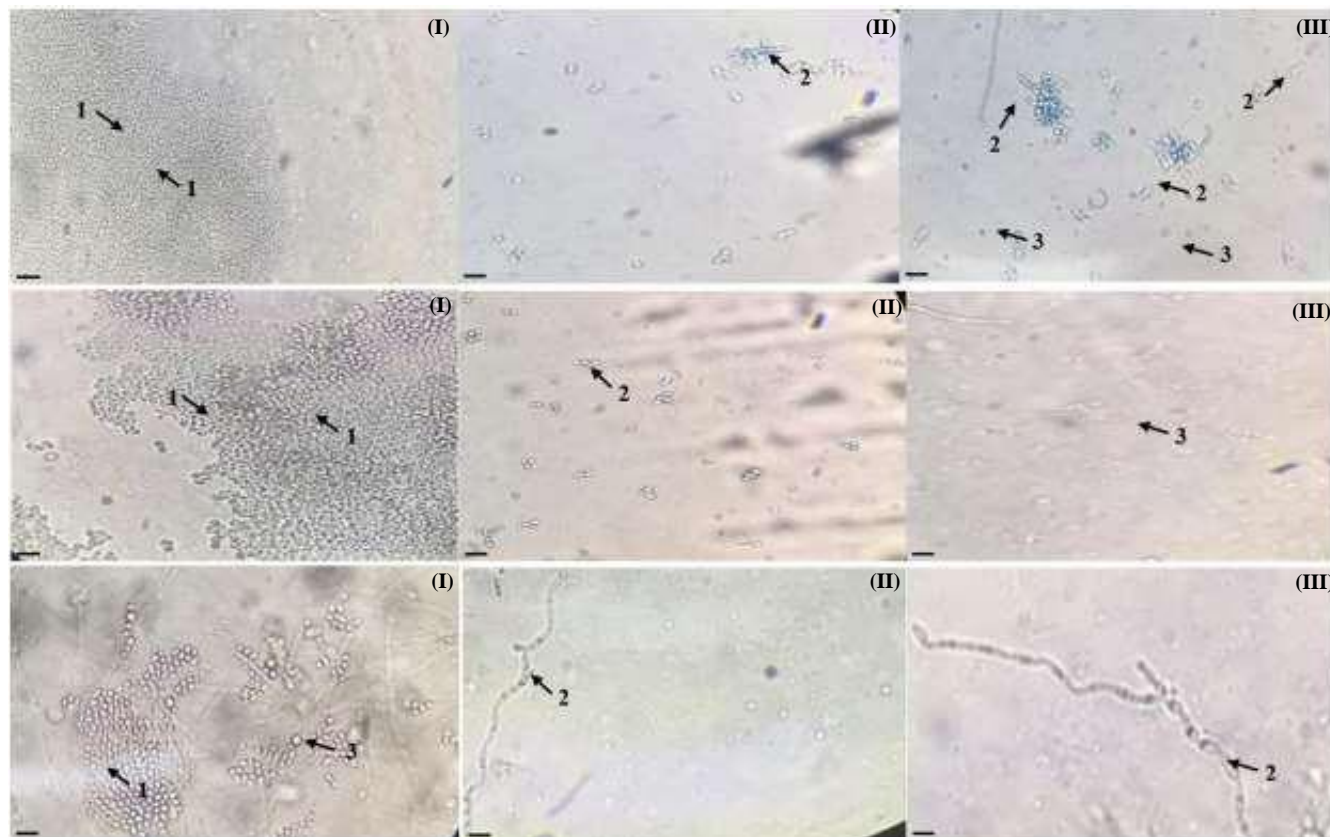
Análise microscópica em ampliação 400x, em escala 100 μm . As imagens mostram células de leveduras individuais (1), pseudo-hifas (2) e clamidoconídios (3).

Figura 12: Análise de micromorfologia de *Candida tropicalis* ATTC-13803 (A), LM-98 (B) e LM-111 (C) na ausência (I) presença de A1Cl (II) e fluconazol (III).



Análise microscópica em ampliação 400x, em escala 100 μ m. As imagens mostram células de leveduras individuais (1), pseudo-hifas (2) e clamidoconídios (3).

Figura 13: Análise de micromorfologia de *Candida parapsilosis* ATTC-22019 (A), LM-78 (B) e LM-197 (C) na ausência (I) e presença de A1Cl (II) e presença de fluconazol (III).



Análise microscópica em ampliação 400x, em escala 100 μ m. As imagens mostram células de leveduras individuais (1), pseudo-hifas (2) e clamidoconídios (3).

Relatos na literatura, mostram que a transição morfológica levedura-hifas tem sido descrito como um potencial fator de virulência para *Candida*, pois desempenha um papel importante na colonização e invasão aos tecidos do hospedeiro (KAMLI et al., 2021). Além disso, esse estado de transição facilita a adesão à superfície, entrelaçamento com o biofilme, supercrescimento de leveduras, permitindo fixação e evasão das respostas imunes do hospedeiro (KHAN et al., 2021), relatados como potenciais alvos estratégicos emergentes de novas drogas.

Nesse estudo, observamos que A1Cl e fluconazol em concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM reduziram o desenvolvimento de hifas, pseudo-hifas e clamidoconídios (fatores de virulência) importantes estruturas que estão envolvidas em infecções de unhas (Figuras 10 a 12 e Tabela 2).

Considerando a importância dos fatores de virulência de diferentes espécies de *Candida* na patogenicidade de onicomicoses, os resultados se mostram bastante promissores porque é o primeiro relato da ação da molécula A1Cl sobre a expressão de hifas, pseudo-hifas,

blastoconídios e clamidoconídios. De fato, essa inibição de fatores de virulência se apresenta como um possível alvo estratégico de grande importância terapêutica. Esta informação ganha ainda mais destaque porque a molécula apresentou resultados superiores ao fluconazol, representante dos fármacos azóis amplamente utilizados no tratamento de onicomicoses.

Resultados recentes de nosso grupo mostrou que A1Cl tem efeito na redução de germinação de conídios por *Aspergillus flavus* FERREIRA et al. (2021) o que poder ser um bom ponto de partida para identificar novos compostos potenciais para desenvolver agentes antifúngicos mais eficazes, seguros e menos tóxicos.

Em trabalho anterior cujo objetivo foi avaliar a atividade antifúngica de derivados fenilacetamidas substituídas sobre espécies de *Candida* resistentes também foram constatadas alterações na micromorfologia das células fúngicas, com ênfase para redução no número de hifas e pseudo-hifas, sugerindo que seu alvo de ação, seja sobre a redução de estruturas de virulência (ALABI et al., 2022). Por sua vez, Alabi et al. (2022) afirmaram que essa ação antifúngica tem relação direta de compostos com presença de substituintes de átomos de cloro em porção fenil, pois potencializou significativamente a atividade de fluconazol contra cepas de *C. albicans* resistentes a azóis.

No presente estudo, A1Cl mostrou potencial efetivo contra a mudança de transição morfológica de levedura para hifas e pseudo-hifas, de modo que os resultados encontrados até o momento já se apresentam de grande relevância, embora impulse a investigar quais possíveis alvos, como parede celular, membrana celular e biofilmes estão envolvidos com estes eventos e como A1Cl atuam sobre eles.

6.3 Ensaio de atividade antifúngica *in vitro* com alvos específicos da molécula A1Cl na parede celular fúngica

Os resultados obtidos para esse protocolo experimental estão expressos na Tabela 3. De modo que os valores de CIMs não aumentaram para A1Cl na presença de sorbitol 0.8 mol/L, variando de 16 a 64 µg/mL (*C. albicans*) e 32 a 256 µg/mL (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*), sugerindo que esse composto não desencadeia seus efeitos fungicidas na desestabilização de integridade em estruturas de parede celular. Além disso, o crescimento fúngico foi detectado quando todas as cepas foram cultivadas na ausência de drogas (viabilidade do inóculo), enquanto DMSO 5% a Tween 80 2% não inibiu o crescimento de fungos.

Vale ressaltar que houve aumento significativo dos valores de CIM para caspofungina na presença de sorbitol 0,8 mol/L, entre 1 a 32 µg/mL (*C. albicans*), 2 a 16 µg/mL

(*C. tropicalis*) e de 8 a 16 µg/mL (*C. parapsilosis*), o que mostra que esse fármaco ainda representa uma importante opção terapêutica na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas.

Tabela 3: Efeito de A1Cl e caspofungina contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na ausência e presença de sorbitol 0,8 mol/L.

Cepas fúngicas	A1Cl (µg/mL)*		Caspofungina (µg/mL)*	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol	Ausência de Sorbitol	Presença de sorbitol
<i>C. albicans</i>				
ATCC - 76645	16	16	0,0312	1
LM - 441	64	64	2	32
LM - 600	64	64	2	8
<i>C. tropicalis</i>				
ATCC - 13803	32	32	0,25	2
LM - 98	256	256	1	2
LM - 111	256	256	2	16
<i>C. parapsilosis</i>				
ATCC - 22019	32	32	0,5	8
LM - 78	64	64	2	16
LM - 197	256	256	2	16

*Valores modais de três experimentos.

A estrutura da parede que envolve as células fúngicas confere resistência mecânica necessária para proteção contra a pressão osmótica interna, que de outra forma causaria a lise celular ao empurrar e quebrar a membrana plasmática. No entanto, a parede celular não é apenas um envoltório rígido, ela deve apresentar elasticidade para permitir sua remodelação durante os vários processos morfogênicos que acontecem ao longo do ciclo de vida do fungo, como crescimento celular, separação celular e as relações da célula com o meio ambiente (CURTO et al., 2021).

Essa estrutura é composta por polissacarídeos (70-90%) e proteínas fortemente glicosiladas (10-30%). Embora a composição varie entre diferentes espécies de fungos, a maioria das paredes exibe uma estrutura de camada interna (menos eletrodensa) formada por uma rede fibrilar de $\beta(1,3)$ -D-glucana, $\beta(1,6)$ -D-glucana e quitina, com algumas espécies tendo também muitas fibrilas de $\alpha(1,3)$ -D-glucano e camada externa (mais eletrodensa) mais variável com alta concentração de manoproteínas (GOW et al., 2017; CORTÉS et al., 2019).

A ruptura dessa estrutura tem um grande impacto na sobrevivência das células fúngicas, ocasionando a ruptura de membrana plasmática e a lise celular. É importante ressaltar que essa estrutura está ausente nas células hospedeiras humanas e, conseqüentemente, as drogas antifúngicas que inibem a síntese dos polissacarídeos da parede celular ou que interferem em sua integridade por mecanismos distintos, são geralmente menos prejudiciais do que os azóis ou polieno. Portanto, enzimas que sintetizam polissacarídeos essenciais da parede celular, como β -(1,3) - D -glucano sintase podem ser consideradas um alvo extraordinário para a descoberta de novos compostos seletivos para o tratamento de infecções fúngicas (CORTÉS et al., 2019; FIOŁKA et al., 2020).

O tratamento com fármacos pertencentes a classe de equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) foi estabelecido como uma alternativa de primeira escolha para infecções ocasionadas por espécies de *Candida* formadoras de Biofilmes, com atividade fungicida e manifestada por aumento e distorção celulares significativos, o que contribui para a inibição da proliferação celular (SZYMAŃSKI et al., 2022). Um efeito distintivo de substâncias que atuam ocasionando a desestabilização e/ou inibindo síntese de parede celular fúngica, é que sua ação fungicida pode ser revertida em um meio contendo um estabilizador osmótico, como o sorbitol (FROST et al., 1995; XIE, 2017; JIANG et al., 2018).

Desta forma, caso o produto atue sobre a parede celular, ocorrerá lise das células fúngicas na ausência de um osmoprotetor, mas permite seu crescimento na presença desse estabilizador osmótico (ESCALANTE et al., 2008; JIANG et al., 2018).

Os compostos sintéticos e/ou semi-sintético têm demonstrado historicamente, ao longo de décadas fonte promissora de uma ampla variedade de moléculas puras com potencial terapêutico para o tratamento de onicomicoses. Este é o primeiro relato de uma análise mais específica do potencial antifúngico de AlCl₃, por meio de testes *in vitro* para avaliação de suas ações sobre a parede celular em que buscam correlacionar a atividade inibitória da molécula com outros fármacos antifúngicos, cujo mecanismo de ação já está bem estabelecido.

Diante dos resultados observados pode-se inferir que AlCl₃ não exerce seus efeitos antifúngicos interferindo em estruturas de parede celular, pois não foi necessária maior concentração dos produtos para superar a proteção osmótica conferida pelo sorbitol. Em contrapartida, utilizou-se a caspofungina porque possui mecanismo de ação conhecido, no qual ocorre inibição não-competitiva de β -1,3-glicano sintase levando à desestabilização da parede celular (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Esses resultados corroboram com estudo desenvolvido Ferreira et al. (2021) em que

os valores de CIMs para A1Cl na presença de sorbitol permaneceram os mesmos em relação ao controle (RPMI), contra *Aspergillus flavus*, sugerindo que a molécula não atua em nível da parede celular.

O fármaco padrão (fluconazol) não foi utilizado nesse estudo, pois seu mecanismo de ação envolve efeitos fungistáticos em nível de bloqueio de enzimas presentes na membrana celular, podendo ocorrer alterações dos valores de CIMs, porém, não está correlacionado com os mecanismos de ação em nível de parede celular.

Este ensaio de sorbitol é amplo e complexo, pois pode inferir efeitos de compostos que afetam diretamente a síntese da parede celular, mas também mecanismos regulatórios envolvidos neste processo, incluindo vias de transdução de sinal, como a Proteína Quinase C (PKC), Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK) e Quinases de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKK) (FROST et al., 1995).

Portanto, estudos devem ser realizados para complementar a investigação de seu mecanismo de ação e elucidar a forma com que esta substância exerce seu efeito inibitório. Desta forma, o próximo passo foi investigar seu possível efeito antifúngico em nível de membrana celular fúngica.

6.4 Ensaio de atividade antifúngica *in vitro* com alvos específicos da molécula A1Cl na membrana plasmática fúngica

Os resultados obtidos para esse protocolo experimental estão expressos na Tabela 4. Os valores de CIMs de A1Cl não aumentaram na presença de ergosterol exógeno 400 µg/mL, um esterol protetor de membrana celular fúngica, com valores de CIM de 8 a 64 µg/mL (*C. albicans*), 16 a 64 µg/mL (*C. tropicalis*) e 16 a 128 µg/mL (*C. parapsilosis*). Além disso, o crescimento fúngico foi detectado quando todas as cepas foram cultivadas na ausência de drogas (viabilidade do inóculo), enquanto DMSO 5% a Tween 80 2% não inibiu o crescimento de fungos.

Pode-se observar que houve aumento de CIM de anfotericina B na presença de ergosterol 400 µg/mL com valores de CIM de 32 a 64 µg/mL (*C. albicans*), 32 µg/mL (*C. tropicalis*) e de 32 a 64 µg/mL (*C. parapsilosis*), o que mostra que esse fármaco também representa uma importante opção terapêutica na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas.

Tabela 4: Efeito de A1Cl e anfotericina B contra *Candida albicans*, *Candida. tropicalis* e *Candida parapsilosis* na ausência e presença de ergosterol µg/mL.

Cepas fúngicas	A1Cl (µg/mL)*		Anfotericina B (µg/mL)*	
	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
<i>C. albicans</i>				
ATCC -76645	8	8	0,125	32
LM - 441	64	64	0,25	32
LM - 600	64	64	0,25	64
<i>C. tropicalis</i>				
ATCC - 13803	16	16	0,25	32
LM - 98	64	64	0,5	32
LM - 111	64	64	0,25	32
<i>C. parapsilosis</i>				
ATCC - 22019	16	16	0,125	32
LM - 78	64	64	0,25	64
LM - 197	128	128	0,25	64

*Valores modais de três experimentos

A membrana plasmática fúngica é uma estrutura altamente complexa que desempenha papéis críticos nos processos infecciosos, pois esta barreira medeia a secreção de fatores de virulência, endocitose, síntese de parede celular e morfogênese de hifas invasivas. Além disso, as proteínas inseridas em membrana formam um aracabouço estrutural, medeia o transporte de nutrientes, detectam pH, osmolaridade e favorecem sinalizações do ambiente extracelular (DOUGLAS; KONOPKA, 2016).

O ergosterol é um componente da membrana celular fúngica, que regula a estrutura da membrana, auxilia na transdução de sinal para segundos mensageiros, organização do citoesqueleto, crescimento celular e transporte de substâncias entre a bicamada lipídica (HARIKRISHNAN et al., 2022). Desta forma, a ausência desses componentes, desempenha um papel crítico na membrana plasmática na virulência de modo que aumenta a fluidez da membrana facilitando a difusão de vários medicamentos.

Polienos e azóis são duas classes de antifúngicos que prejudicam a função do ergosterol na membrana celular fúngica. A primeira classe (anfotericina B), tem como alvo direto o ergosterol, formando canais na membrana celular que causam a perda de permeabilidade da membrana, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), com influxo de íons de hidrogênio e efluxo de íons de potássio da célula que causam acidificação celular e moléculas essenciais a sobrevivência celular, como aminoácidos e açúcares e comprometimento de funções enzimáticas. A ação fungistática pode ser obtida usando diferentes concentrações de

polienos enquanto ações fungicidas podem ser geradas variando o pH e usando uma alta concentração de drogas (AHMED et al., 2021).

Nessa perspectiva, foi avaliada a capacidade dos compostos teste formarem complexos com ergosterol. E pode-se observar que na presença de ergosterol exógeno, a molécula sintética A1Cl não se complexam a este e não se ligam ao ergosterol da membrana. Portanto, a CIM do A1Cl não aumentou na presença do ergosterol exógeno, porque não foi observado uma maior concentração do produto no meio de crescimento para que ocorresse interação com ergosterol da membrana fúngica.

Em contrapartida, utilizou-se anfotericina B porque possui mecanismo de ação conhecido, no qual ocorre interação com ergosterol da membrana para servir de controle positivo (ESCALANTE et al., 2008).

Desta forma, pode-se inferir que a molécula sintética não desencadeia seus efeitos fungicidas por meio de ligação aos esteróis de membrana, não ocasionando desestabilização na integridade e funcionalidade de membrana celular. O próximo passo foi investigar seu possível efeito antifúngico em associação com o fluconazol.

6.5 Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Método de *Checkerboard*) de 2-cloro-*N*-Fenilacetamida associado com antifúngico padrão

Os resultados para esse protocolo experimental encontram-se expressos na Tabela 5. A associação entre A1Cl e fluconazol demonstrou efeitos antifúngicos de indiferença ($ICIF \geq 1$ e ≤ 4), de modo que nenhuma das associações modulou de modo positivo a ação antifúngica contras as espécies fúngicas, visto que as concentrações inibitórias dos compostos combinados não foram significativamente inferiores (efeitos sinérgicos) ou superiores (efeitos antagônicos) às concentrações inibitórias isoladas destes mesmos produtos.

Tabela 5: Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre A1C com fluconazol sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* - Método *Checkerboard*.

Cepas fúngicas	*CIM Isolado	*CIM combinado	Índice *ICIF
<i>C. albicans</i>			
ATCC - 76645	1	2	(2) Indiferente
LM - 441	1	0,5	(1,5) Indiferente
LM - 600	1	0,5	(1,5) Indiferente
<i>C. tropicalis</i>			
ATCC - 13803	1	1	(2) Indiferente
LM - 98	1	1	(2) Indiferente
LM - 111	1	2	(3) Indiferente
<i>C. parapsilosis</i>			
ATCC - 22019	1	1	(2) Indiferente
LM - 78	0,5	2	(2,5) Indiferente
LM - 197	1	0,5	(1,5) Indiferente

*CIM, concentração inibitória mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$); *ICIF, índice de concentração inibitória fracionada

O problema terapêutico decorrente de isolados de *Candida* resistentes a azóis requer novos alvos e o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas para alcançar a redução do uso ou dosagem de drogas antifúngicas. Esse fenômeno de resistência pode ser explicado, em parte, como resultado da pressão seletiva causada pela profilaxia, manejo terapêutico e uso irracional de antifúngicos (ALVES et al., 2020). Com este propósito, a associação de A1CI e fluconazol foi avaliada a fim de buscar efeitos sinérgicos.

Por esse motivo, avaliamos possíveis interações entre A1CI e fluconazol pelo modelo experimental de *checkerboard*, que consiste em método empregado em pesquisas científicas para avaliar as interações medicamentosas no intuito de superar as limitações de monoterapias antifúngicas.

A eficiência de taxa de inibição/morte de microrganismos, é baseado na redução na duração de terapia clínica para que o surgimento de resistência aos fármacos sejam minimizados, além de buscar a ampliação do espectro de ação e diminuição da toxicidade relacionada aos tratamentos convencionais, na medida em que a associação entre dois compostos permitam a redução de doses dos agentes antimicrobianos a serem administrados (OLIVEIRA, 2015).

No entanto, a determinação do índice de concentração inibitória fracionada avalia

apenas a suscetibilidade do fungo à combinação de medicamentos, impedindo que fatores associados aos hospedeiros, como imunidade, morbidades, vias de administração, envelhecimento populacional e uso crônico de terapias medicamentosas que afetam grandemente a eficácia de um agente antifúngico em prática clínica, nem sempre podem ser simulados em estudos *in vitro* ou em modelos animais (SPITZER et al., 2017).

Nas interações sinérgicas a associação de dois compostos deve levar a uma redução de quatro vezes a CIM de ambos os fármacos em comparação a CIM de cada um quando utilizado isoladamente, ou seja, o efeito combinado de duas drogas é maior do que a soma das atividades individuais de cada droga (WAMBAUGH et al., 2020).

São atribuíveis, as inibições de diferentes estágios em vias bioquímicas intracelulares fúngicas essenciais a sobrevivência celular, aumento da penetração do agente antifúngico proporcionada pela ação de outro antifúngico na membrana plasmática ou danos a parede celular, aumentando a permeabilidade e facilitação de movimento de drogas por meio da membrana celular até seus alvos. Além disso, inibição de proteínas carreadoras e inibição de diferentes alvos celulares simultaneamente, ocorrem por meio de interações sinérgicas (JOHNSON et al., 2004; OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

Em contraste, um efeito “não interativo”, “indiferente” ou “interação zero” reflete uma resposta de efeito antifúngico linear esperada quando dois agentes combinados não “mascara” e nem aumenta a eficácia de outra droga, ou seja, denota o efeito que é esperado ou medido quando a combinação de vários medicamentos leva a nenhuma sinergia e não apresentam efeito aditivo ou antagônico (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011; PEMOVSKA, et al., 2018). Além do mais efeitos aditivos e combinações não interativas indicam que a combinação de efeitos de duas substâncias é um efeito de “soma pura” (CAESAR; CECHE, 2019).

Por último, uma combinação de drogas é antagônica quando a atividade combinada das drogas é menor do que a resposta de cada droga individual (PEMOVSKA, et al., 2018).

Esses efeitos podem ocorrer por meio de vários mecanismos distintos, como: ação antifúngica direta no mesmo sítio de ação que resulta em diminuição da capacidade de outros compostos para exercer seus efeitos competitivos no mesmo local ou em um alvo alterado; Adsorção à superfície da célula por uma molécula que inibe a ligação de outro agente antifúngico ao seu local alvo de atividade; Modificação de um alvo após exposição a um agente antifúngico que torna o patógeno menos susceptível aos efeitos de outros antifúngicos (JOHNSON et al., 2004).

Baseado em diferentes mecanismos de ação apresentados de drogas, a associação torna-

se uma opção necessária e viável a ser estudada para avaliar o comportamento da combinação, redução em concentrações e aumento de atividade antifúngica.

Resultados semelhantes foram descritos por Ferreira et al. (2021) em que detectaram interações antagônicas entre A1Cl com anfotericina B e voriconazol contra *Aspergillus flavus*, demonstrando que avaliações em combinações são urgentes e necessárias para novas estratégias contra infecções fúngicas. Embora o uso de terapias combinadas ainda não sejam promissoras no modelo avaliado, evidências de indiferença *in vitro* podem significar muito no processo de determinação da terapia adequada.

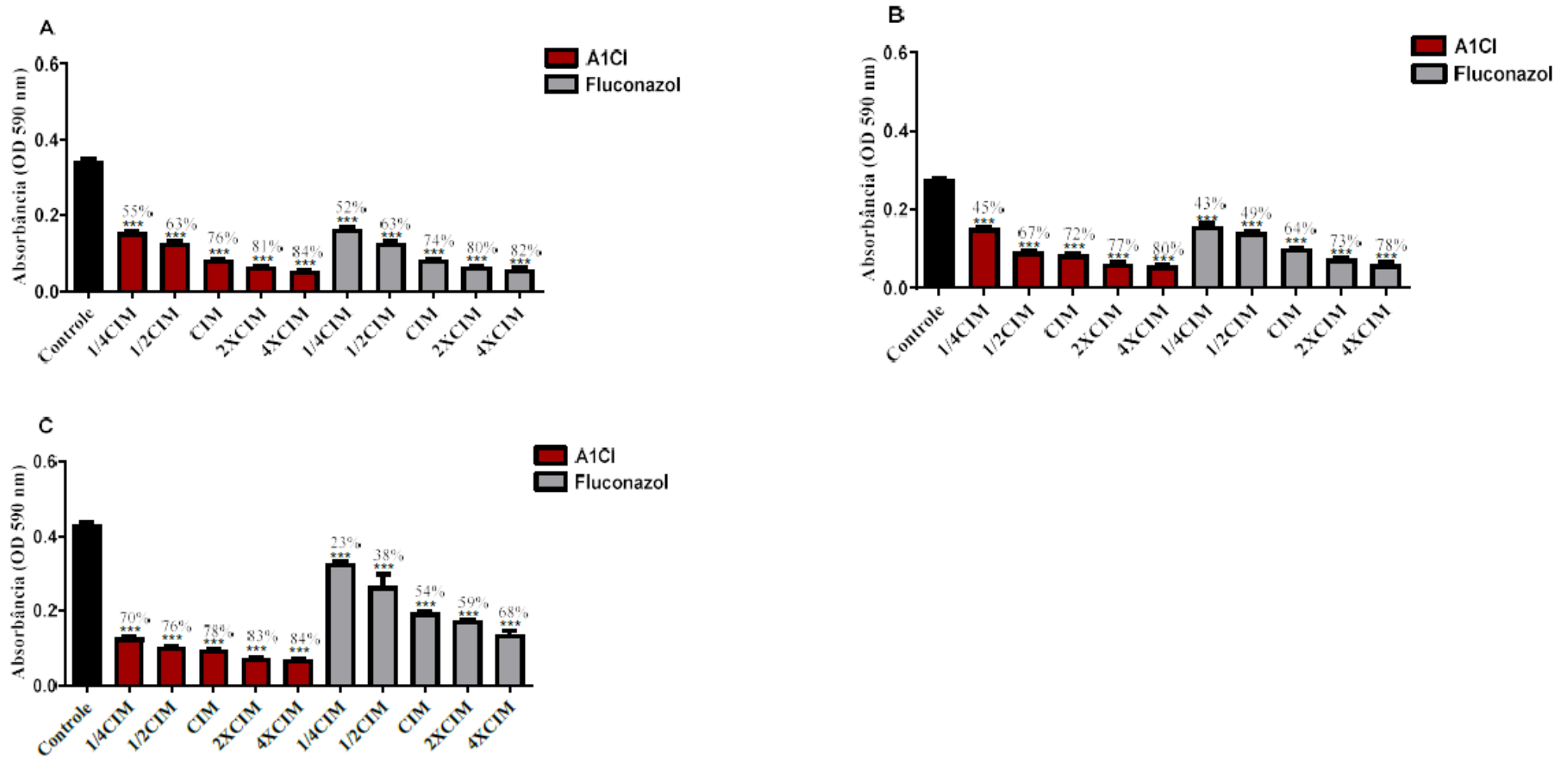
Diante dos resultados, estudos devem ser realizados para complementar a investigação de seu mecanismo de ação e elucidar a forma com que esta substância exerce seu efeito inibitório. Desta forma, investigamos o possível efeito antibiofilme de A1Cl em modelos *in vitro*.

6.6 Sensibilidade de biofilmes em modelos *in vitro*

De acordo com os resultados obtidos para os ensaios de efeito antibiofilme é possível inferir que A1Cl mostrou uma forte atividade de inibição em concentrações subinibitórias. Após 1/4 CIM houve redução em mais de 30% na formação de biofilme e em mais 40% na inibição de biofilme pré-formado (ruptura) contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsislosis* quando comparados aos respectivos grupos não-tratados Figura (14 a 19).

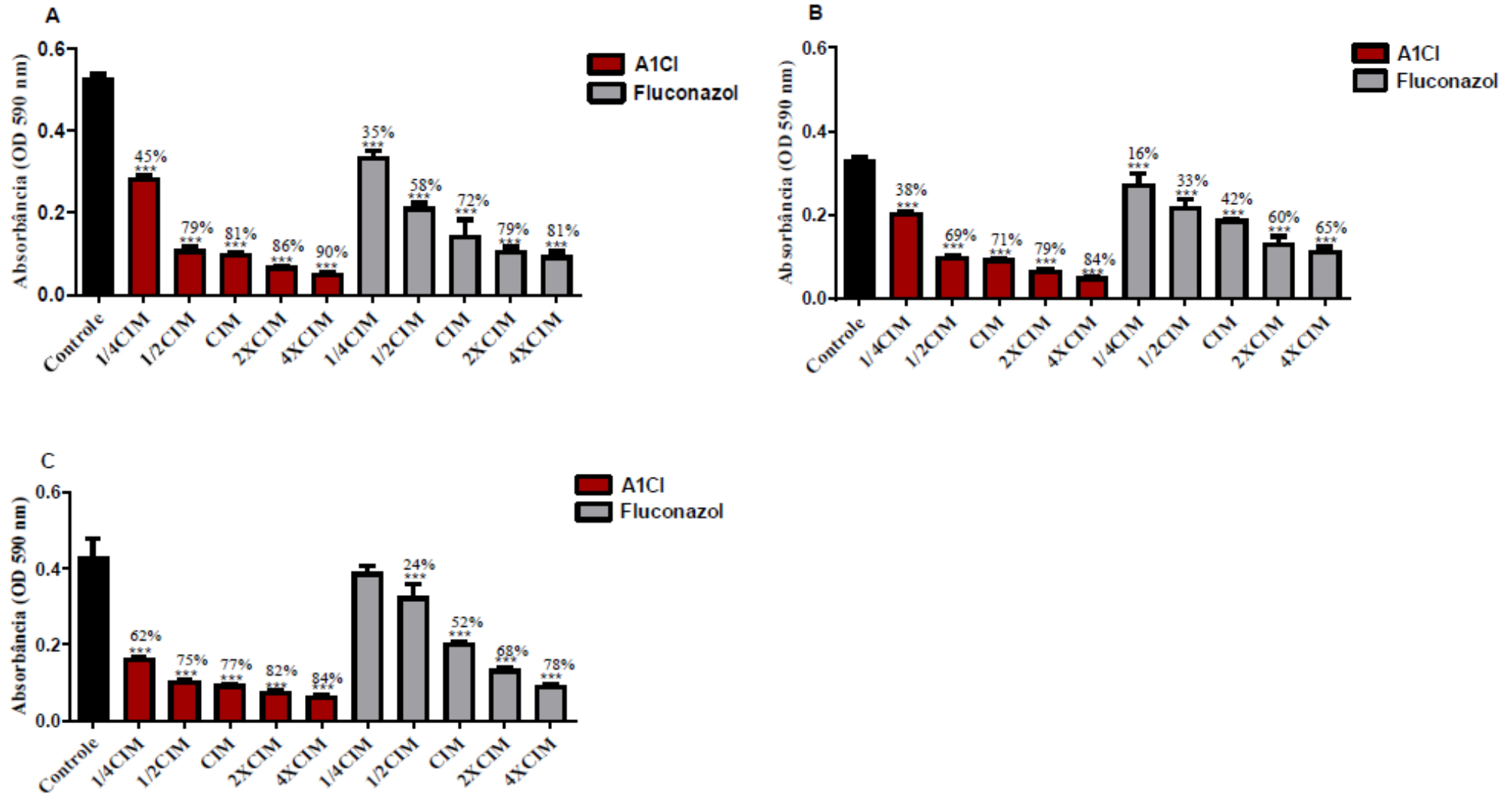
Para os valores de CIM, utilizados neste estudo, A1Cl promoveu uma inibição superior a 60% no efeito antibiofilme de células planctônicas e em mais de 57% de biofilme pré-formado (ruptura), quando comparados os respectivos grupos controles (Figura 14 a 19), enfatizando o potencial efeito antibiofilme dessa molécula em concentrações-dependentes.

Figura 14: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre a formação do biofilme *in vitro* de *Candida albicans* ATTC-76645 (A), LM - 441 (B) e LM-600 (C).



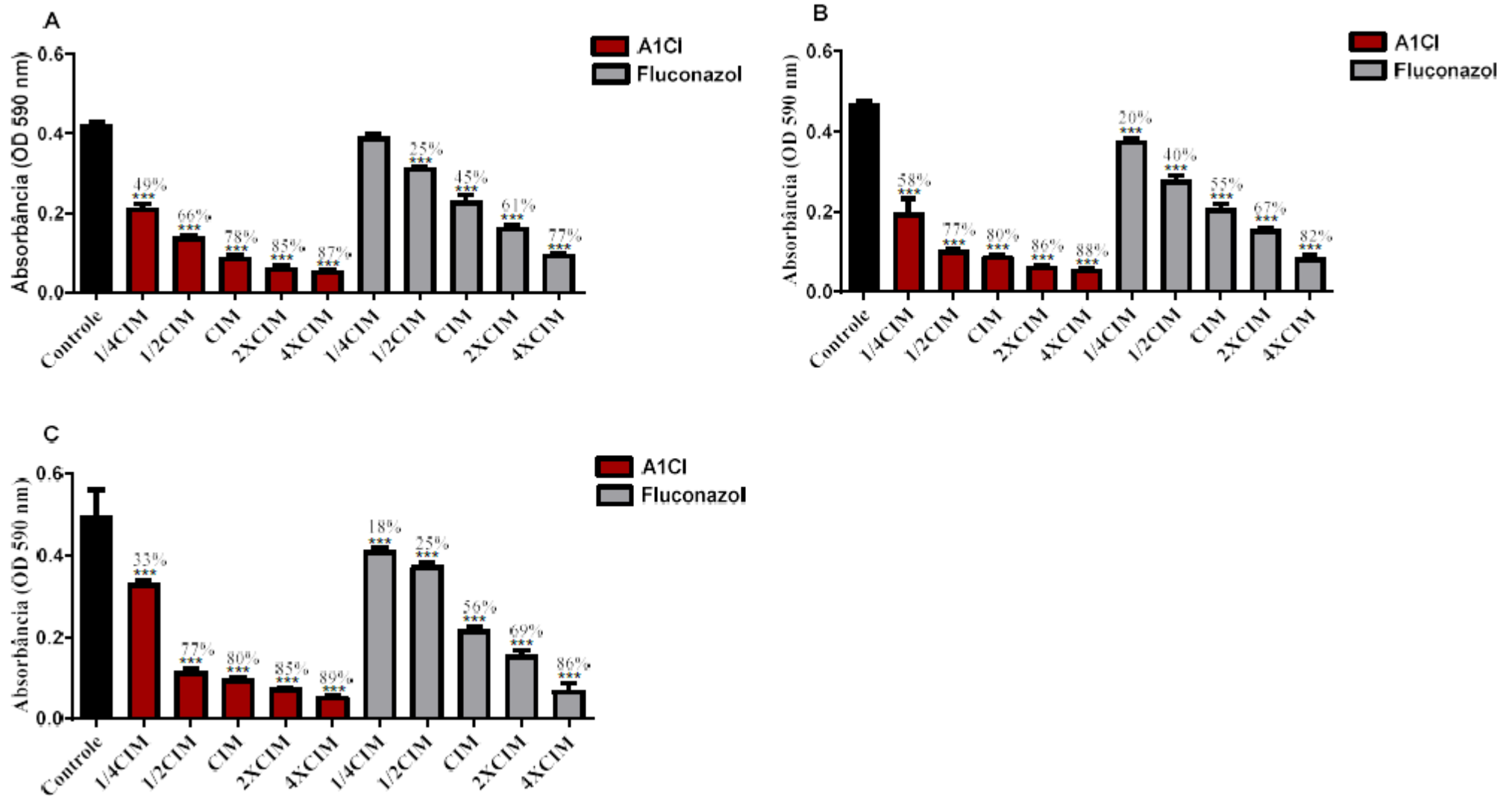
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 15: Efeito inibitório de A1CI e fluconazol sobre a formação do biofilme *in vitro* de *Candida tropicalis* ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM-111 (C).



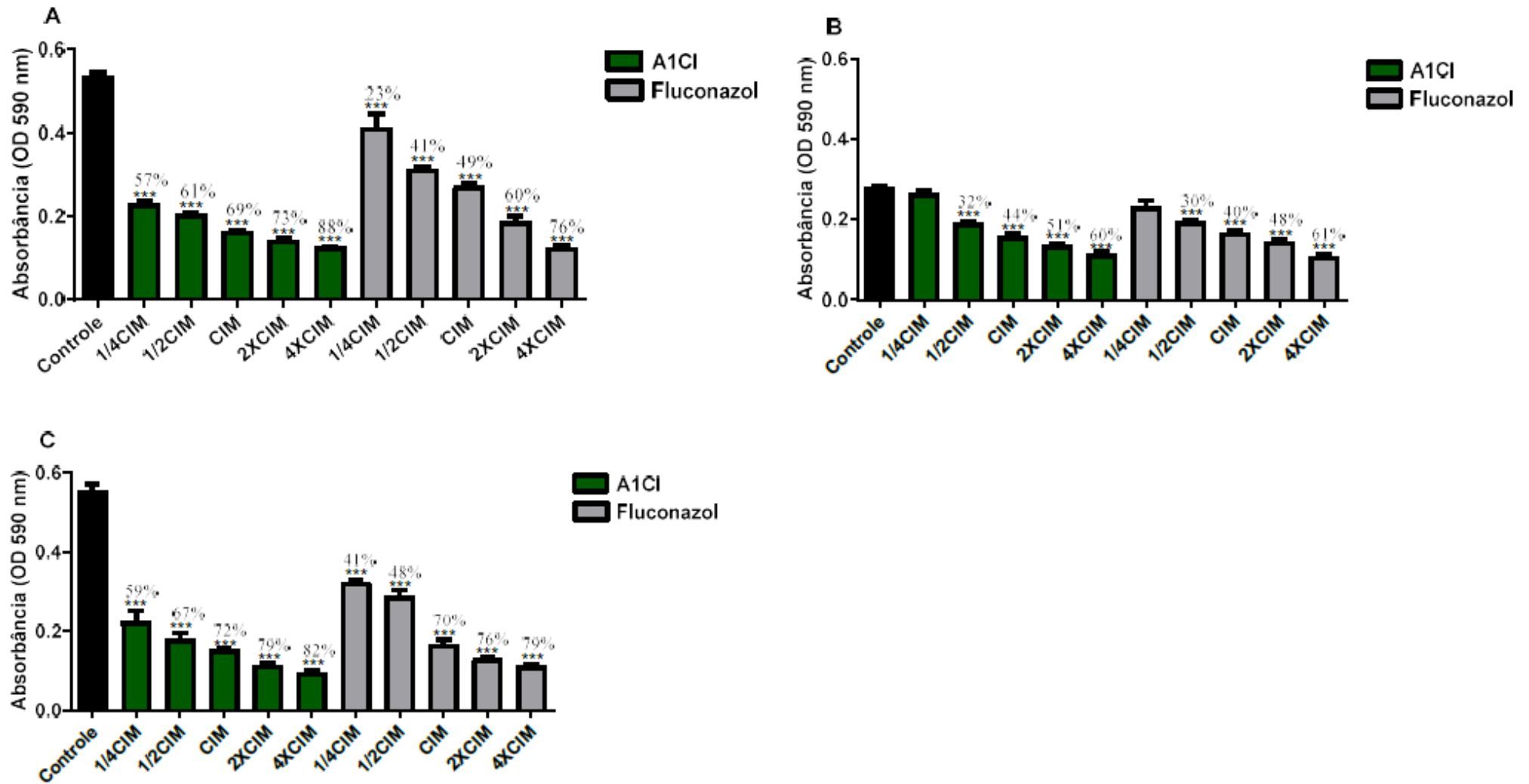
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 16: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre a formação do biofilme *in vitro* de *Candida parapsilosis* ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-197 (C).



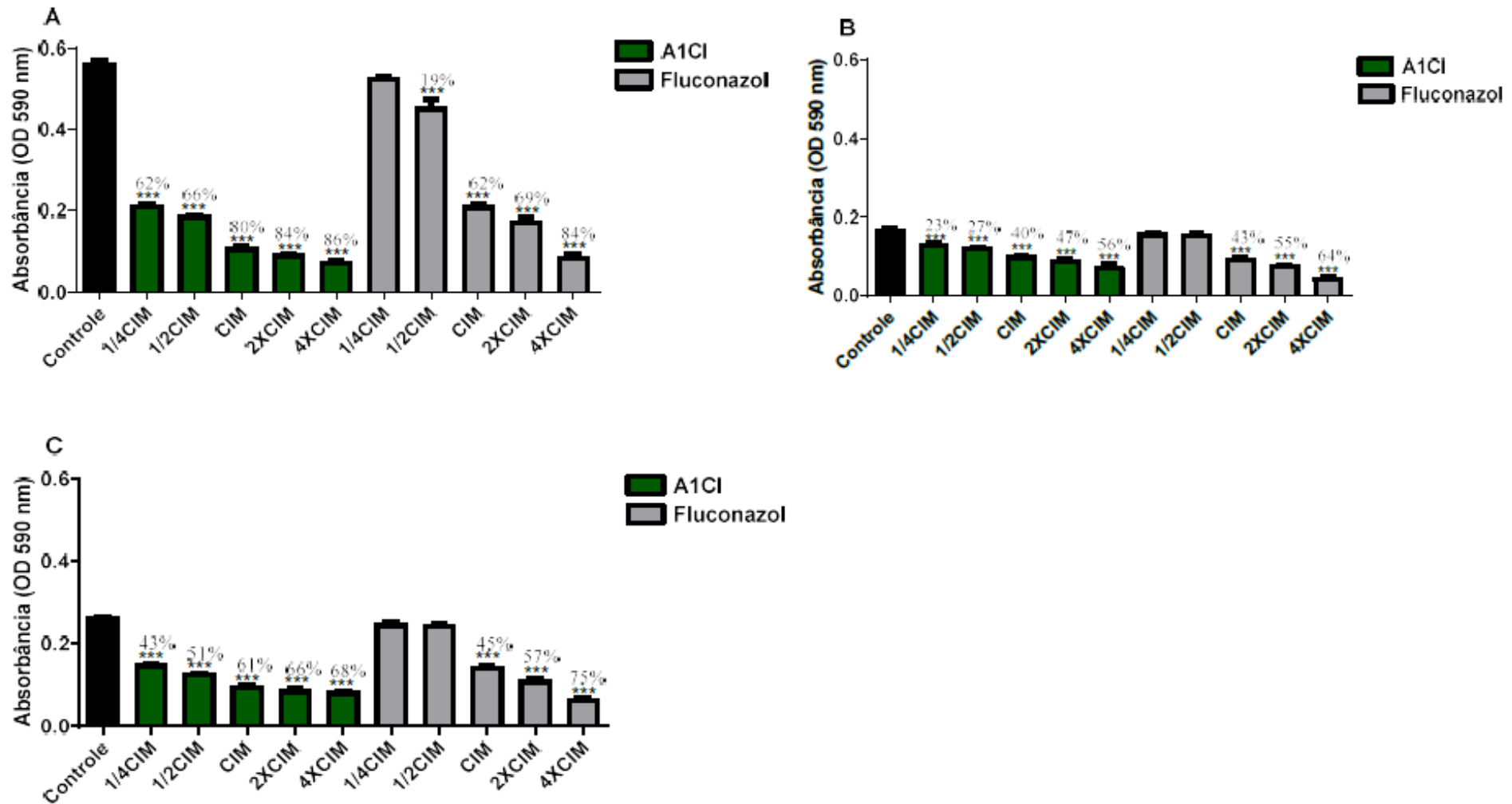
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 17: Efeito inibitório de A1CI e fluconazol sobre biofilme pré-formado (ruptura) *in vitro* de *Candida albicans* ATTC-76645 (A), LM - 441 (B) e LM-600 (C).



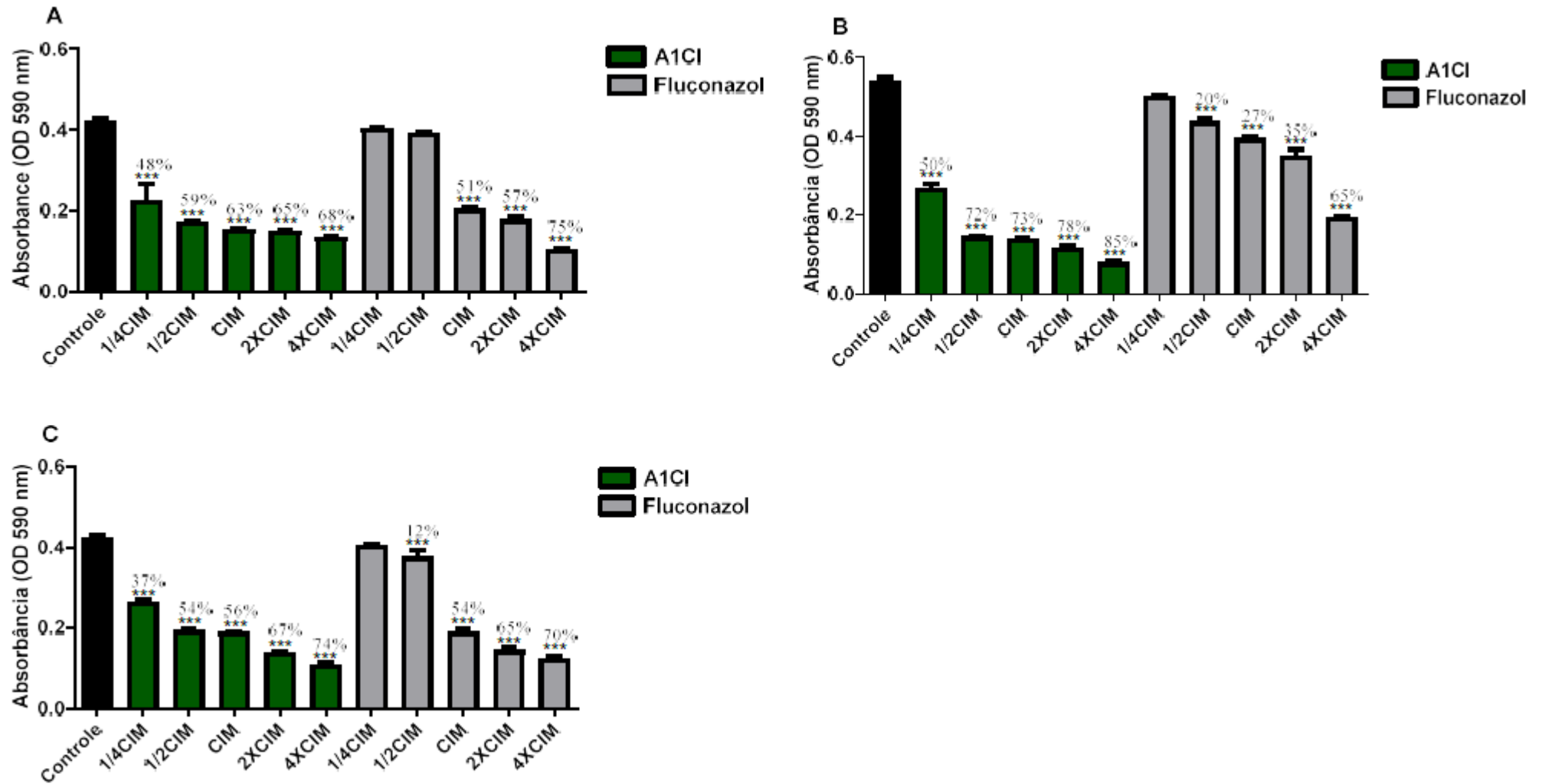
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 18: Efeito inibitório de A1CI e fluconazol sobre biofilme pré-formado (ruptura) *in vitro* de *Candida tropicalis* ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM-111 (C).



Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 19: Efeito inibitório de A1Cl e fluconazol sobre biofilme pré-formado (ruptura) *in vitro* de *Candida parapsilosis* ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-197 (C).



Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Espécies de *Candida* têm a capacidade de desenvolver biofilmes que tornam mais forte a sua aderência aos tecidos e aumento de resistência aos medicamentos antifúngicos. Sabe-se que, uma vez formado o biofilme, as células de *Candida* spp dentro de matrix exopolimérica tornam-se intrinsecamente resistentes (AHAMAD et al., 2022), o que implica em alta taxa de infecção, recidiva da doença e graves implicações clínicas, gerando um grande problema em saúde pública.

Além disso, os tecidos humanos queratinizados, são nichos comuns para a formação e progressão de biofilmes que fornecem resistência a altas concentrações de compostos antifúngicos que variam de acordo com as espécies de microrganismos, qualidade do ambiente, nutrientes e muitas outras variantes (HEREDERO-BERMEJO et al., 2020).

A capacidade de alguns microrganismos, como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* formarem biofilmes, contribui para formação de virulência, resistência fúngica e falhas terapêuticas. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas são ferramentas eficazes para remover biofilmes não só melhorando o tratamento de infecções relacionadas, mas também oferecer benefícios para retardar a propagação da resistência aos medicamentos antifúngicos (SALARI et al. 2018).

No modelo experimental de inibição de formação e ruptura de biofilme pré-formado *in vitro* foi possível observar que A1Cl apresentou atividade antifúngica, correspondendo a efeito concentração dependente. De modo que a ação antibiofilme desse composto pode estar envolvido na capacidade de impedir fixação superficial de células planctônicas, substâncias de matrix polimérica extracelular (EPS) e na destruição de rede polimérica (microcolônias), resultando em características fenotípicas diferenciais que levam à diminuição de resistência aos antifúngicos e as possíveis ações do sistema imunológico do hospedeiro.

De acordo com a literatura, biofilmes são estruturas de resistência que impedem ação de fármacos, e geralmente as concentrações efetivas são superiores a CIM, de modo que os agentes antifúngicos são geralmente menos eficazes contra biofilmes formados do que células planctônicas. Vários estudos relatam que biofilmes de *Candida* são 30-2000 vezes mais resistentes do que as células planctônicas contra drogas antifúngicas (MORENO et al., 2021).

Kwasny e Opperman (2010) classificam uma substância com boa atividade antibiofilme quando inibe $\geq 80\%$ do crescimento do biofilme e inibir $\geq 40\%$ do crescimento planctônico em comparação com controles não tratados. No presente estudo, observa-se que A1Cl apresentou significativa atividade antibiofilme em concentrações sub inibitórias com $\geq 20\%$ para inibição do crescimento sobre a formação de biofilme e ruptura de biofilmes pré-formados e

suprainibitórias em $\geq 70\%$ sobre a formação e ruptura de biofilmes, a partir dos valores de CIMs.

Portanto, pode-se observar que mesmo em concentrações abaixo de CIM A1Cl interferiu na formação de biofilmes e na ruptura, sendo evidenciado um efeito antibiofilme potencialmente promissor da substância, o que deve ser investigado e avaliado também contra outros microrganismos potencialmente patogênicos, a fim de obter um novo agente para combater este relevante fator de virulência.

A boa atividade antibiofilme dessa molécula, pode ser atribuída a presença do átomo de cloro e regiões de ressonância *N*- Fenilacetamida. Essas estruturas químicas podem permitir maior penetração na rígida matriz polimérica extracelular dos biofilmes de *Candida* e assim exercer ação antifúngica em baixas concentrações. Relatórios sobre a eficácia desses compostos sintéticos contra biofilmes fúngicos, são limitados. Todavia, nosso grupo de pesquisa mostrou resultados semelhantes de atividade antibiofilme de compostos com derivados *N*-Fenilacetamida por Melo et al. (2020), de modo que A1Br diminuiu consideravelmente a formação de biofilme de *Cryptococcus neoformans* em concentrações 4xCIM em mais de 80%, caracterizando uma resposta em concentração-dependente.

Foi observado que várias classes de medicamentos antifúngicos, notoriamente os azóis, quando utilizados na prática clínica em concentrações abaixo do ideal, aumentam o potencial de formação de biofilme por diferentes mecanismos, favorecendo a progressão, aumento de virulência e cronicidade em infecções fúngicas, fato esse evidenciado em nossa pesquisa, visto que em concentrações sub-inibitórias, o fluconazol não promoveu erradicação na formação e ruptura de biofilmes.

El-Houssaini et al. (2019), mostraram que o fluconazol não tem efeito antibiofilme em concentrações subinibitórias. Além do mais, Gupta et al. (2019) descreveram a baixa suscetibilidade de espécies de *Candida* ao fluconazol e que a droga não inibiu o desenvolvimento do biofilme, evidenciando uma forte fator de resistência aos antifúngicos, o que também foi observado na presente pesquisa.

A indução da formação de biofilme em concentrações subinibitórias em resposta a presença de fármacos é um processo clinicamente relevante, porque durante o tratamento da infecção, uma parte da população de microrganismos é exposta a níveis subótimos, mesmo quando as condições recomendadas de uso do medicamento, são seguidas.

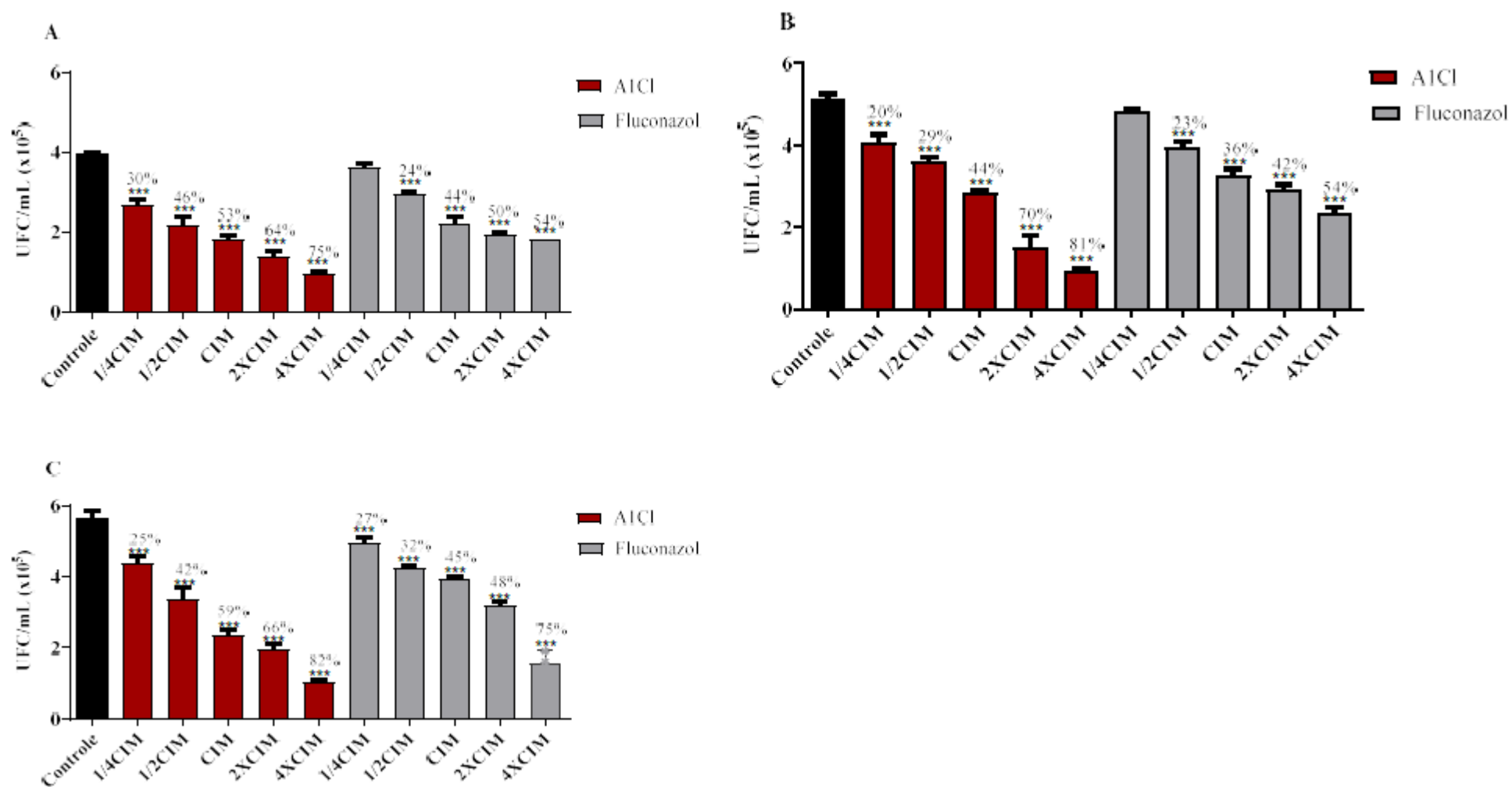
Considerando que o biofilme é um dos principais mecanismos de resistência aos fármacos convencionais utilizados em prática clínica e baseado nos resultados promissores dessa substância, o próximo passo do estudo foi avaliar o efeito antibiofilme em metodologia que mimetizasse ao máximo as infecções em unhas de humanos, como no modelo *ex-vivo* de infecção de fragmentos de unhas sadias na presença e ausência de drogas.

6.7 Sensibilidade de biofilmes em modelos *ex vivo*

Com base nos resultados obtidos para efeito antibiofilme em fragmentos de unhas, A1CI mostrou uma atividade inibitória em $\geq 50\%$ contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsislosis*, levando em consideração a menor concentração em que não ocorreu crescimento visível (CIM), tanto para as células planctônicas e ruptura de biofilmes em unhas, quando comparados os respectivos grupos controles (Figura 13 a 18), enfatizando o potencial efeito antibiofilme dessa molécula em concentração-dependente.

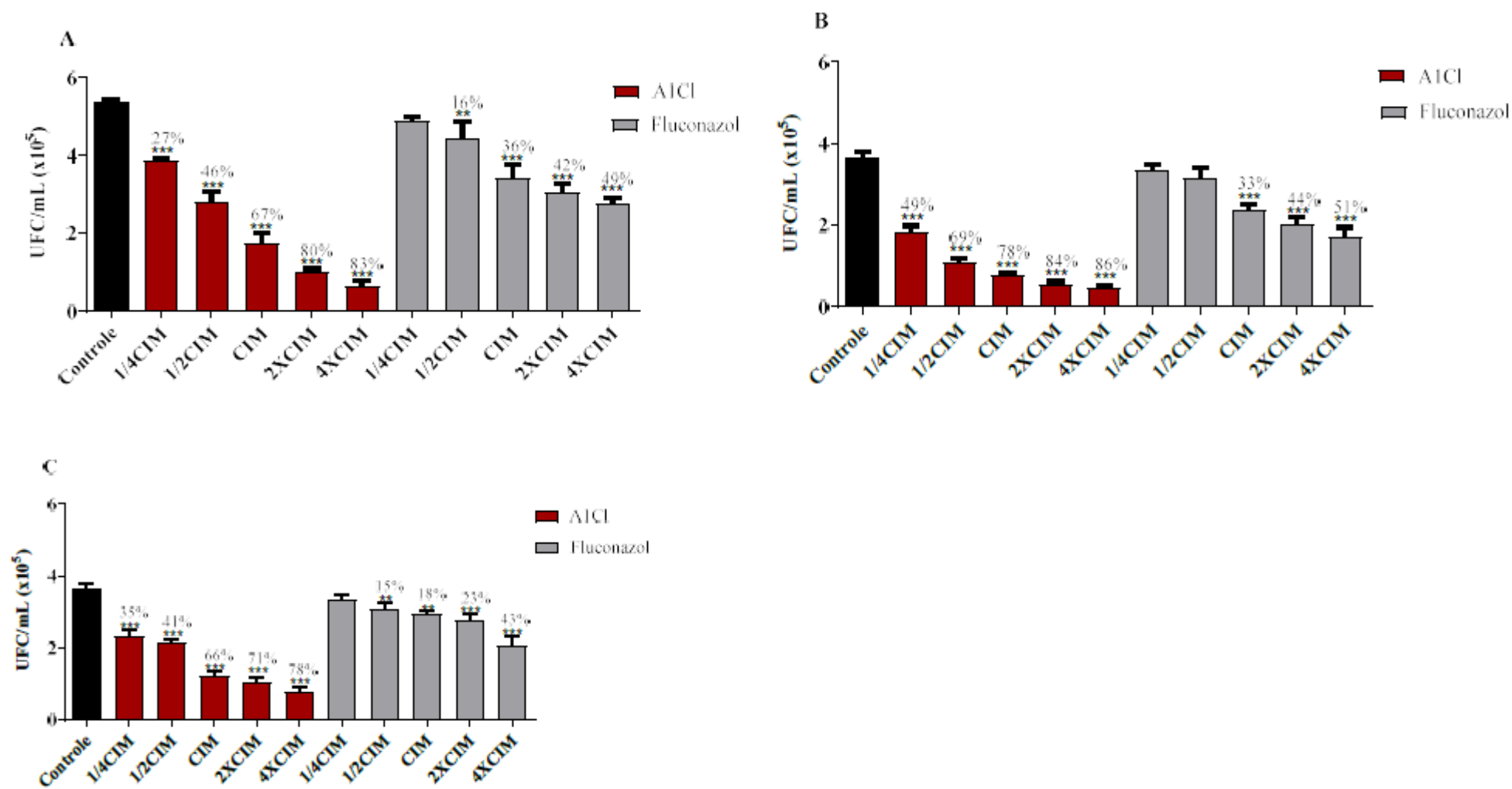
Todavia, para o fluconazol alcançar o mesmo efeito antibiofilme em $\geq 50\%$ foi necessário 4xCIM para inibir o crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsislosis* sobre os fragmentos ungueais, caracterizando resistência ao principal fármaco utilizado no tratamento para onicomicoses e esses dados corroboram com os resultados obtidos nos experimentos de CIMs.

Figura 20: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre células planctônicas em fragmentos de unhas (*ex vivo*) frente *Candida albicans* ATTC-76645 (A), LM - 441 (B) e LM-600 (C).



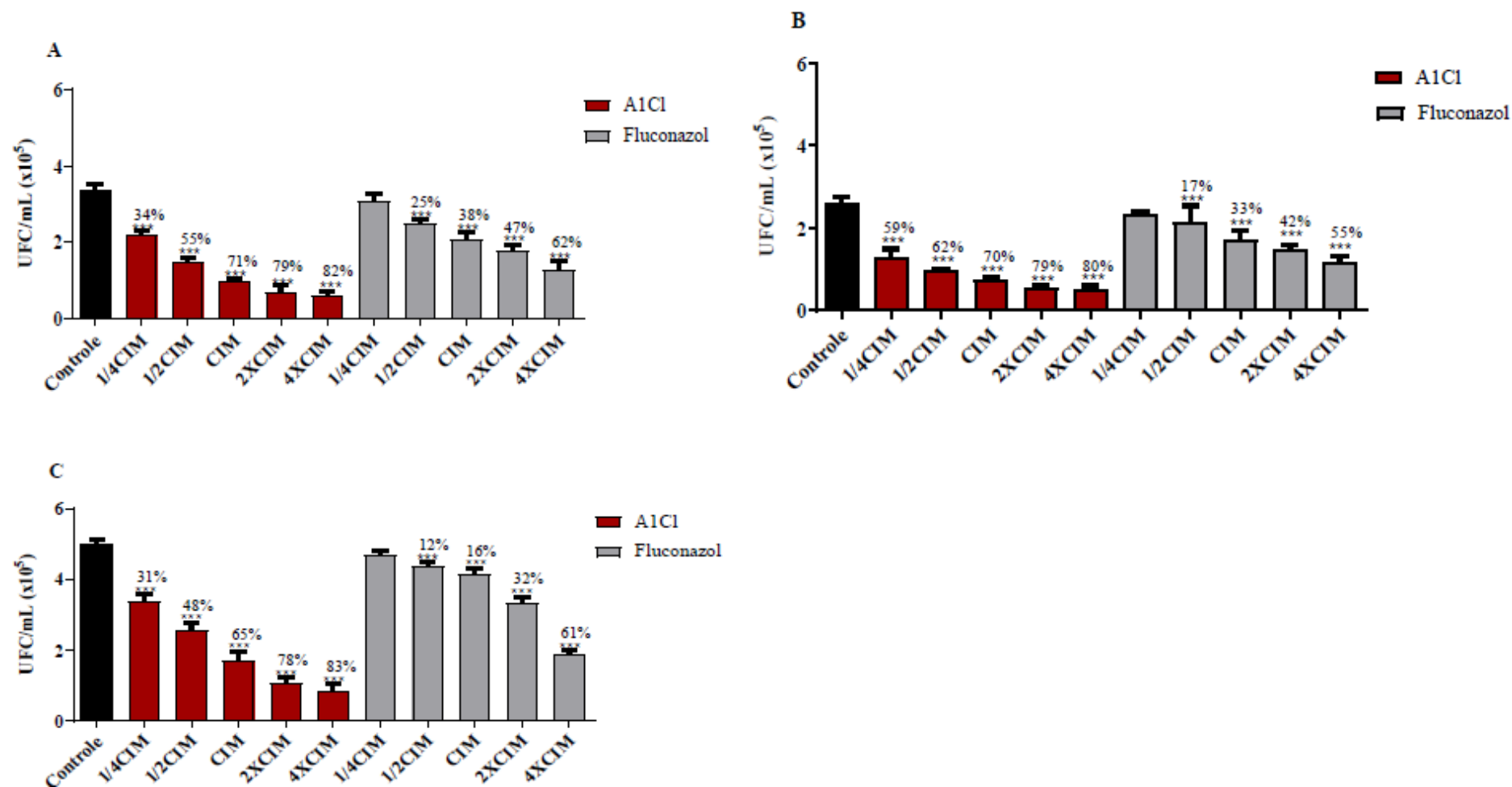
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 21: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre células planctônicas em fragmentos de unhas (*ex vivo*) frente *Candida tropicalis* ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM - 111 (C).



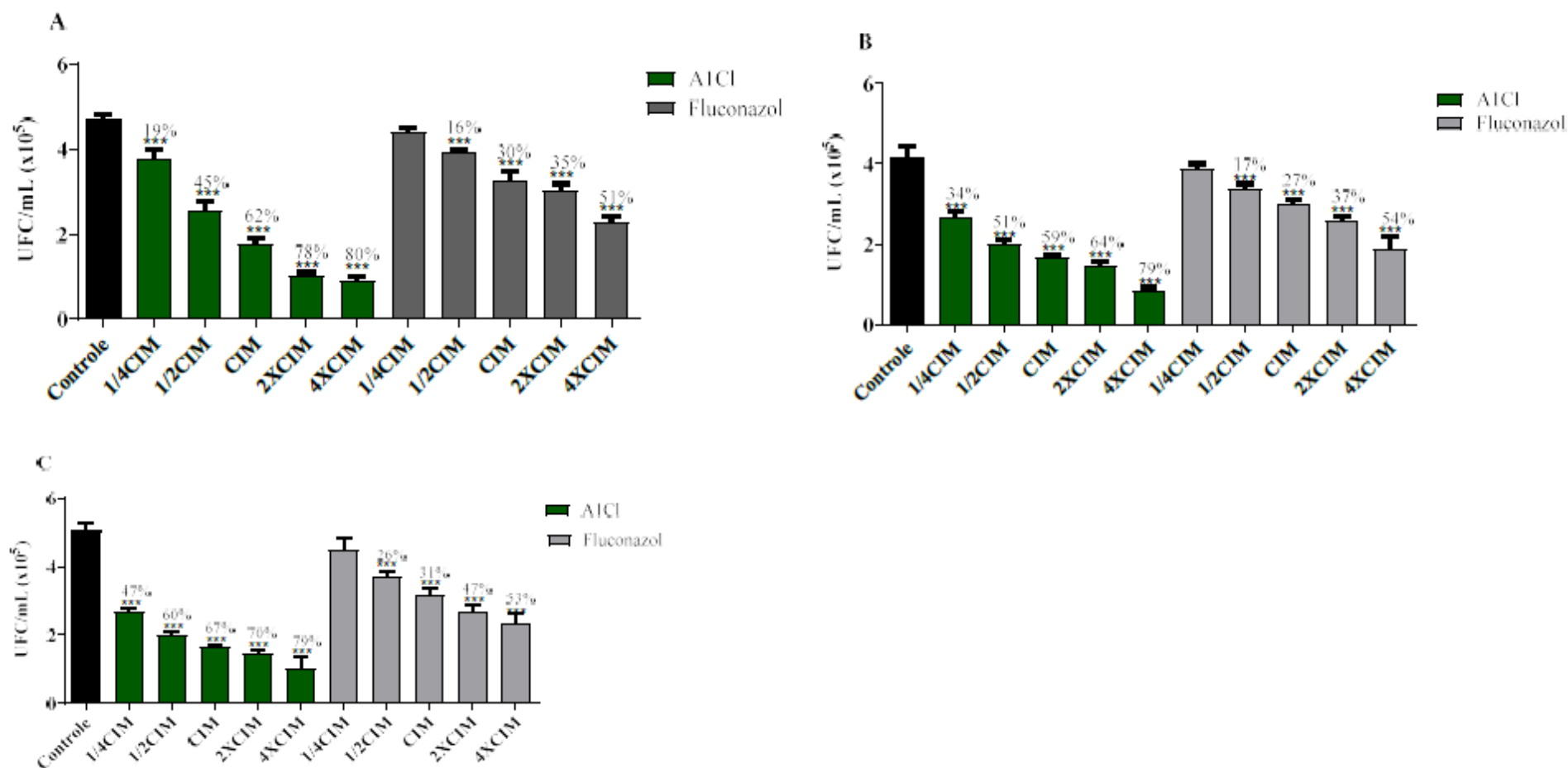
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 22: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre células planctônicas em fragmentos de unhas (*ex vivo*) frente *Candida parapsilosis* ATTC-22019 (A), LM - 78 (B) e LM-197 (C).



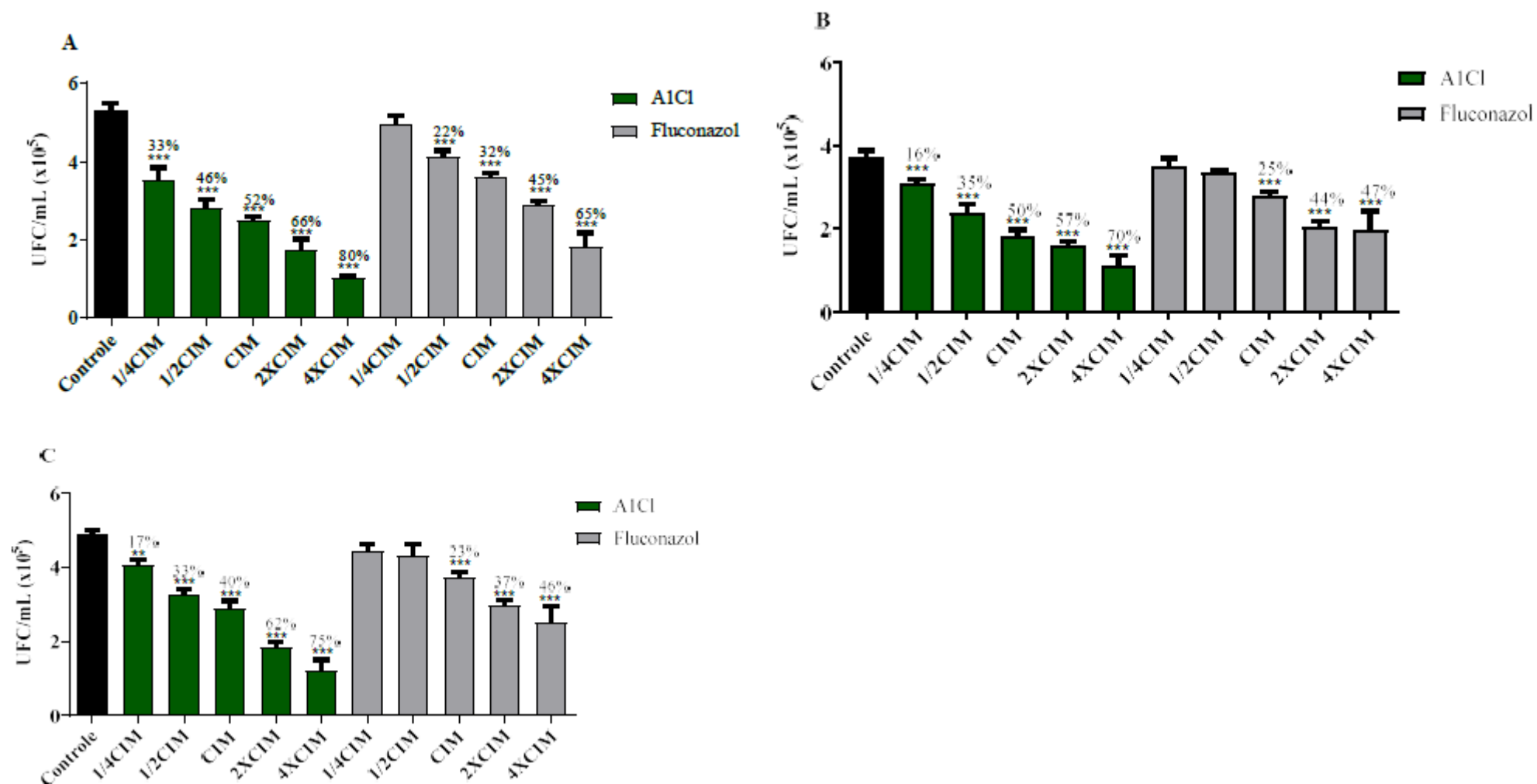
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 23: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre ruptura de biofilmes pré-formados em fragmentos de unhas (*ex vivo*) frente *Candida albicans* ATTC-76645 (A), LM-441 (B) e LM-600 (C).



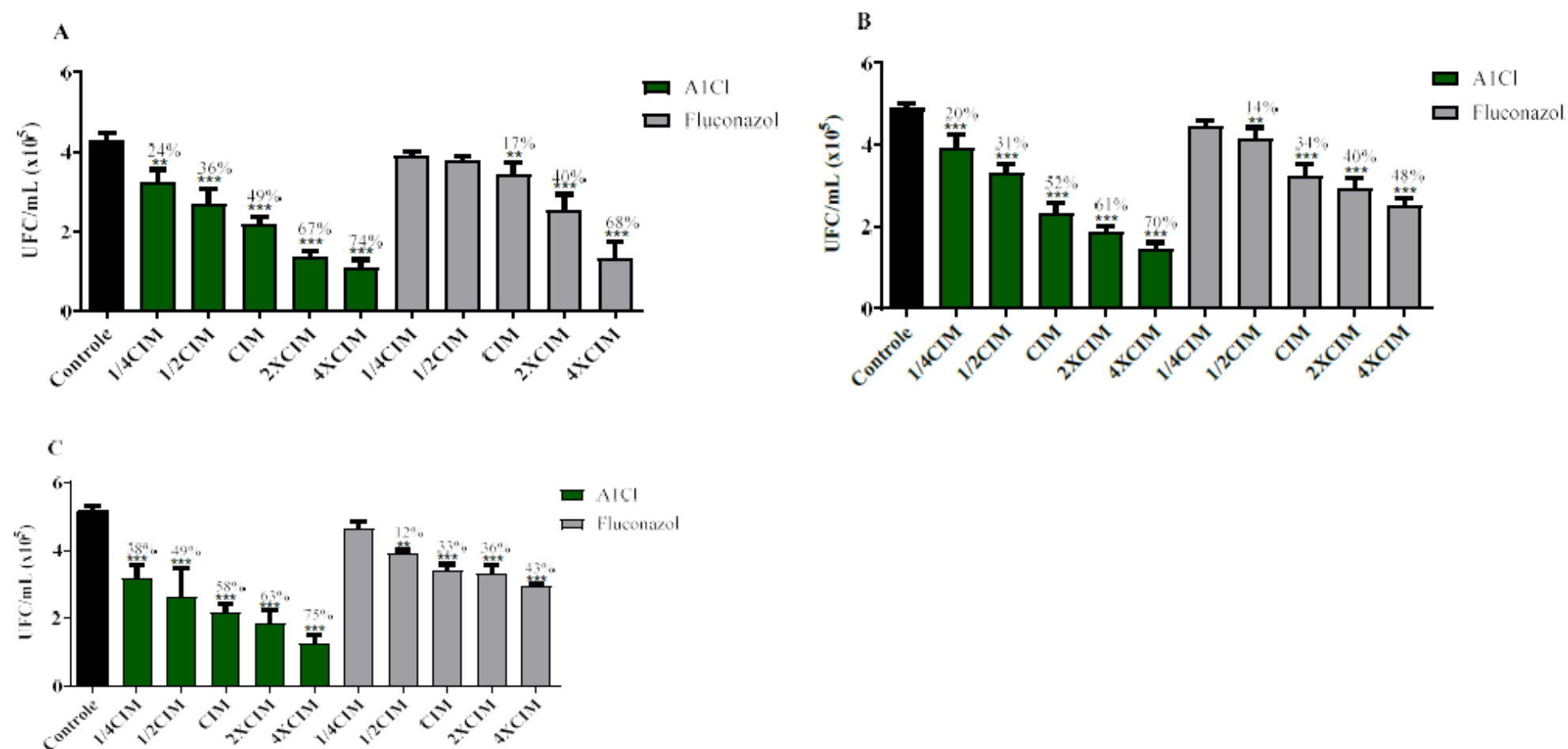
Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 24: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre ruptura de biofilmes pré-formados em fragmentos de unhas (*ex vivo*) frente *Candida tropicalis* ATTC-13803 (A), LM - 98 (B) e LM-111 (C).



Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

Figura 25: Efeito antibiofilme de A1Cl e fluconazol sobre ruptura de biofilmes pré-formados em fragmentos de unhas (*ex-vivo*) frente *Candida parapsilosis* ATTC-22019 (A), LM-78 (B) e LM-197 (C).



Os resultados estão expressos como média aritmética. Análise de variância de uma via (ANOVA): seguido de pós-teste teste de Tukey; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle negativo.

A capacidade dos microrganismos de aderir ao tecido do hospedeiro e formar biofilmes, além de ser um fator essencial na etiopatologia de onicomicoses, também pode ser um importante mecanismo de resistência às lesões, fontes de disseminação da doença e resistência aos antifúngicos convencionalmente utilizadas no tratamento dessas infecções (PERES et al., 2010; JASIM et al., 2016).

Nas últimas décadas a existência de infecções fúngicas em unhas humanas como um substrato em modelos experimentais *in vitro* para a formação de biofilme tem favorecido na compreensão de transição de crescimento planctônico para formação sésil pelo fato de que a interação e adesão aos tecidos do hospedeiro, impacta diretamente no acometimento e severidade de onicomicoses (GUPTA et al., 2016).

Baseado nessa premissa, os modelos experimentais *ex vivo* são fundamentais para a avaliação de novos fármacos, uma vez que tentam mimetizar as condições *in vivo*. Selecionamos fragmentos de unhas humanas como um modelo *ex vivo* com base em três pontos: (1) A1Cl mostrou atividade antifúngica em diferentes concentrações; (2) o uso tópico de antifúngicos pode ser mais seguro do que a terapia oral; (3) o potencial uso tópico de formulações com A1Cl possibilita estudos futuros de aplicações clínicas.

Além do mais, a busca por modelos *ex vivo* substituem e otimizam estudos *in vivo* promovendo o bem-estar animal, visto que esses modelos promovem uma melhor simulação do comportamento infeccioso em seu ambiente natural, auxiliando na compreensão dos aspectos físicos, químicos e moleculares de interação desses microrganismos com o meio hospedeiro.

Recentemente, diversas evidências foram estendidas para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* com uso de fragmentos de unhas como substrato para o crescimento do biofilme (VILA et al., 2015a; VILA et al., 2015b). No presente estudo, os resultados dos efeitos antibiofilme em unhas, sugerem que concentrações subinibitórias de A1Cl, são promissoras para erradicação de formas planctônicas e na penetração da droga com ruptura de biofilmes, evidenciando um efeito concentração-dependente (Figuras 20 e 25).

Ao passo que o fluconazol, não apresentou atividade nessas concentrações, sendo necessário altas concentrações para desempenhar um efeito antibiofilme no modelo avaliado. Isto é uma achado extremamente importante, porque o fluconazol é o antifúngico de referência no tratamento sistêmico para onicomicoses ocasionadas por *Candida* (HALVAEE et al., 2021).

Vários estudos relataram que a resistência dos biofilmes associada ao gênero *Candida* frente aos azólicos é particularmente pronunciada, dada a alta tolerância desses microrganismos, que permite a sua proliferação mesmo quando expostos a concentrações 1.000

vezes maiores do que as necessárias para inibir as células planctônicas (SCORZONI et al., 2017). De fato, vários estudos têm mostrado a ineficácia de terapia antifúngica contra diferentes biofilmes fúngicos.

Esses resultados corroboram com achados de Gupta et al (2019), em estudos de crescimento de biofilme planctônico, a suscetibilidade de fluconazol para espécies de *Candida* foi reduzido e que o fármaco não promoveu inibição no desenvolvimento de biofilmes. Assim, concentrações tradicionais de terapias antifúngicas podem não atingir CIMs no interior do biofilme, dificultando o tratamento e remissão da doença.

Globalmente, essas descobertas encorajam o desenvolvimento de novos antifúngicos com mecanismos de ação diferentes daqueles atualmente em uso clínico. Portanto, direcionar biofilmes é crucial para projetar novos antifúngicos, principalmente para o tratamento tópico.

Em recente estudo, Falotico e Lipner (2022) forneceram uma excelente atualização sobre agentes antifúngicos e formulações para permeação em placa ungueal de drogas para o tratamento de onicomicoses. Neste estudo, foi observado que Amorolfina 5%, ciclopirox 8%, solução de efinaconazol 10% e solução de tavaborol 5%, são utilizadas há muito tempo em prática clínica. E que essas condutas terapêuticas, estão se tornando cada vez mais populares porque podem penetrar nos biofilmes, têm menores riscos de interações medicamentosas, uma vez que há pouca ou nenhuma absorção sistêmica do medicamento e não requerem monitoramento laboratorial.

Além disso, as formulações tópicas, como as formas de verniz para unhas, melhoram a eficácia do tratamento por permanecerem em contato com a placa ungueal por longos períodos, liberando a droga no local infectado e atingindo os fungos em uma concentração efetiva (GUPTA et al., 2022).

Nesta perspectiva, novas estratégias em relação à terapia antifúngica, identificação de alvos e tecnologias racionais de design de medicamentos, por meio de estudos computacionais podem acelerar significativamente o processo de desenvolvimento de novos antifúngicos, reduzindo o tempo de cura, com maior segurança clínica e qualidade de vida aos pacientes. Estudos clínicos utilizando AICI podem ser desenvolvidos a partir de ensaios toxicológicos que garantam segurança quanto a dose, formulação e seleção de aplicação clínica, empregadas atualmente no tratamento das onicomicoses.

6.8 Docking Molecular

Os resultados das moléculas ligantes, submetidas ao acoplamento molecular com Dihidrofolato redutase (DHFR), Geranilgeraniltransferase-I (GGTase-I) e Protease aspártica-2

(SAP-2), para investigação de possível ligação em seus sítios ativos, estão expressos na Tabela 6. Todos os alvos avaliados apresentaram RMSD com valores de $<2,0 \text{ \AA}$, durante análise de redocking, indicando encaixes/poses com confiabilidade de acoplamento no sítio alvo.

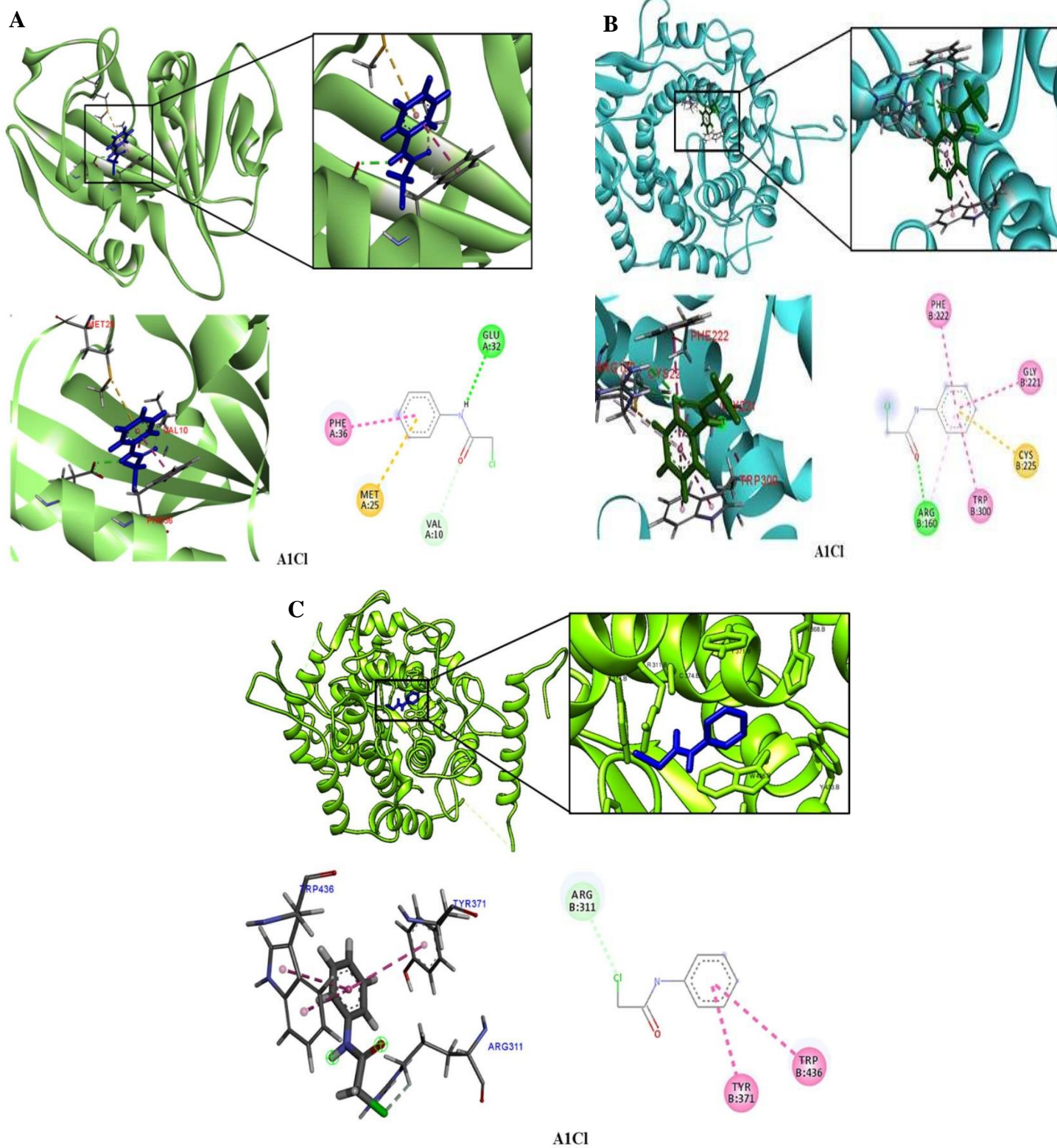
Os resultados para previsão de encaixe basearam-se nas funções de pontuação Moldockscore e Rerankscore, de modo que valores mais negativos indicavam melhores acoplamentos. Desta forma, observamos que A1Cl apresentou valores de energia de ligação maiores ou próximos a fluconazol em pelo menos uma função de pontuação, indicando que essa molécula interfere na funcionalidade dos alvos avaliados. Além do mais, como A1Cl apresentou menor energia de ligação, quando comparados ao ligante PDB para DHFR e SAP-2, argumentamos que essas enzimas, podem ser alvos promissores susceptíveis à ação antifúngica de A1Cl.

Foram analisadas interações detalhadas de A1Cl com as proteínas investigadas e observamos ligação de hidrogênio com o aminoácido Glu32, interação de van der Waals com o aminoácido Val10, interação eletrostática com o aminoácido Met25 e interação hidrofóbica com o aminoácido Phe36 no sítio ativo da enzima DHFR. Ligação de hidrogênio com o aminoácido Arg160, três interações hidrofóbicas com os aminoácidos Gly221, Phe222 e Trp300, e uma interação eletrostática com o resíduo Cys225, para GGTase-I e ligação de hidrogênio com a Thr55 e uma ligação estérica com o aminoácido Gln61 para SAP-2 (Figura 26).

Tabela 6: Energias de ligação (pontuação de Moldock e Rerank) de A1Cl, fluconazol e ligantes de banco de dados de proteínas em alvos moleculares.

Enzima	Classificação	RMSD (\AA)	Score (kcal.mol^{-1}) A1Cl		Score (kcal.mol^{-1}) Fluconazol		Score (kcal.mol^{-1}) Ligante	
			Moldock	Rerank	Moldock	Rerank	Moldock	Rerank
DHFR	Oxiredutase	1.90	-76.04	-65.30	-131.78	-106.20	-41.74	-38.45
GGTase-I	Transferase	1.28	-55.48	-47.43	-66.01	-26.93	-158.16	-38.45
SAP-2	Hidrolase	0.16	-25.13	-23.53	47.26	60.01	-13.68	-11.80

Figura 26: Interação molecular entre A1Cl e resíduos de aminoácidos dos sítios ativos de Dihidrofolato redutase (A), Geranilgeraniltransferase-I (B) e Protease aspártica-2 (C).

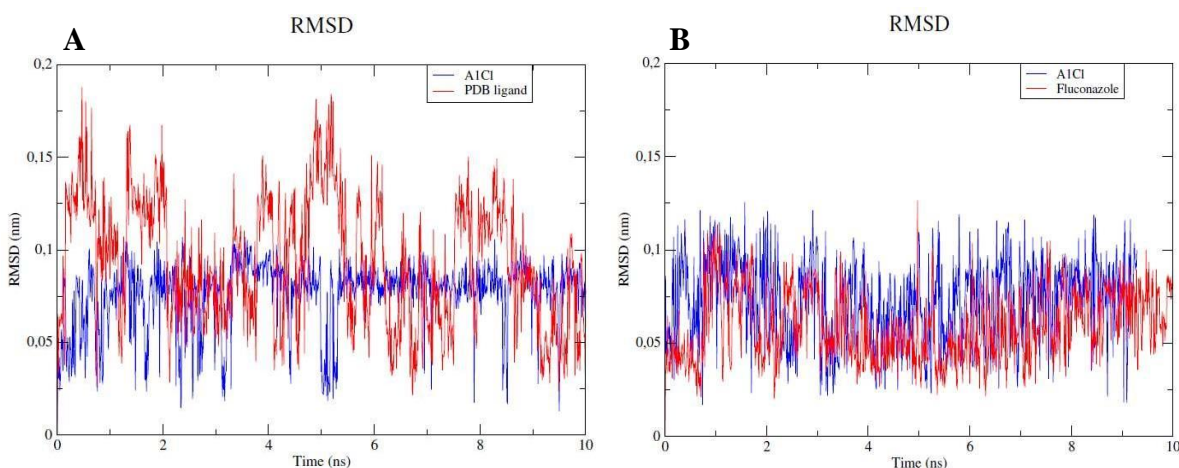


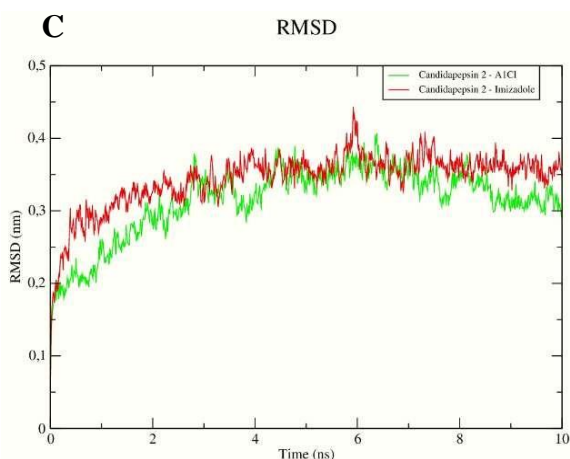
6.9 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para investigar A1Cl, em ligações às proteínas em estudo, sob a influência de solventes, flexibilidade e mudanças conformacionais. O desvio da raiz quadrático médio (RMSD) é essencial para determinar como a ligação do fármaco ao sítio ativo da proteína-alvo afeta sua capacidade para alcançar um estado de equilíbrio e quantificar a estrutura/flexibilidade de complexos proteína-droga durante a simulação (JOSHI et al., 2021).

Para isso, o RMSD foi calculado para os átomos de C α de DHFR e foi evidenciado que o complexo CaDHFR-A1Cl mostrou estabilidade com variações entre 5 e 8 ns e manteve sua estabilidade acima de 10 ns, revelando uma estabilidade superior ao ligante PDB (Figura 27A). Enquanto que a análise do complexo CaGGTase-I, o RMSD mostrou que ambos (A1Cl e fluconazol) apresentaram estabilidade similar (Figura 27B) e para SAP-2, o RMSD apresentou o mesmo padrão de estabilidade para os compostos complexados com flutuações entre 0,2 a 0,3 nm (Figura 27C). Assim, este achado foi indicativo que A1Cl permanece estável dentro do sítio ativo dos alvos moleculares avaliados, mesmo na presença de fatores como solvente, íons, temperatura, pressão e flexibilidade proteica.

Figura 27: Desvio da raiz quadrático médio dos átomos de C α dos compostos A1Cl, ligante PDB e fluconazol com DHFR (A), GGTase-I (B) e SAP-2 (C).





Para entender as diferentes mudanças conformacionais, foi calculada a raiz quadrada média de flutuação (RMSF), para cada aminoácido. O RMSF é usado para analisar como a ligação da droga afeta flexibilidade estrutural da proteína durante a simulação dinâmica molecular, de modo que o maior valor de RMSF indica maior flexibilidade do complexo proteína-ligante.

Considerando que flutuações acima de 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da proteína (Figura 28), observamos que entre os 192 resíduos de aminoácidos para DHFR, apenas alguns resíduos foram responsáveis pelas mudanças conformacionais (Figura 29A). Finalmente, eles não influenciaram a afinidade e energia de ligação de AlCl ao sítio ativo da proteína. Para GGTase-I, dentre os 390 aminoácidos que compõem a proteína, os aminoácidos nas posições 82-84, 89, 147, 148, 256 e 258 são responsáveis pela modificação estrutural da proteína (Figura 29B) e para SAP-2, os aminoácidos 51, 53, 86, 130, 244-249, 251, 256 e 257 são responsáveis pela modificação estrutural da proteína (Figura 29C). Assim, observou-se que esses aminoácidos não influenciam na afinidade de ligação dos compostos ao sítio ativo das enzimas alvos.

Figura 28. Desvio da raiz quadrático de flutuações dos átomos de Ca dos compostos A1Cl, ligante PDB e fluconazol com DHFR (A), GGTase-I (B) e SAP-2 (C).

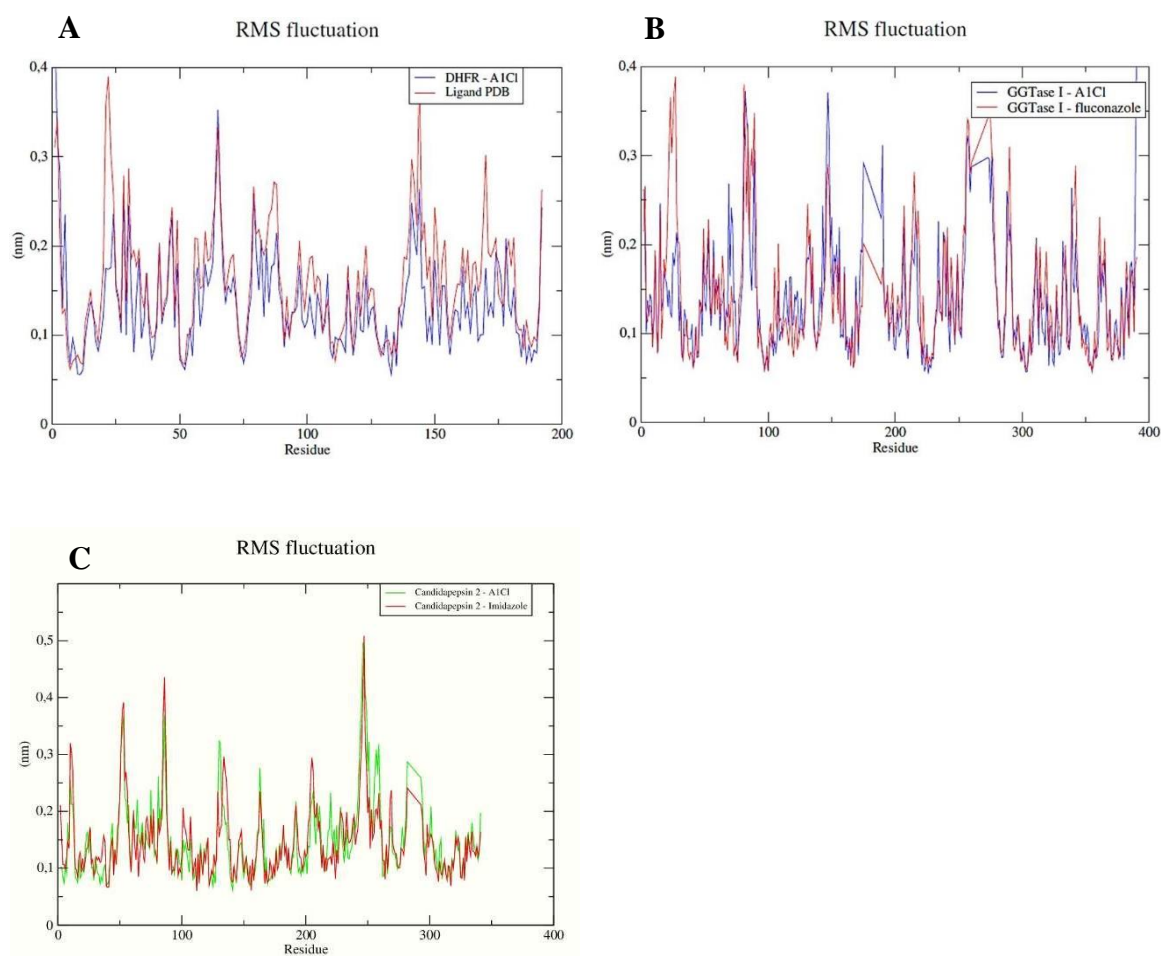
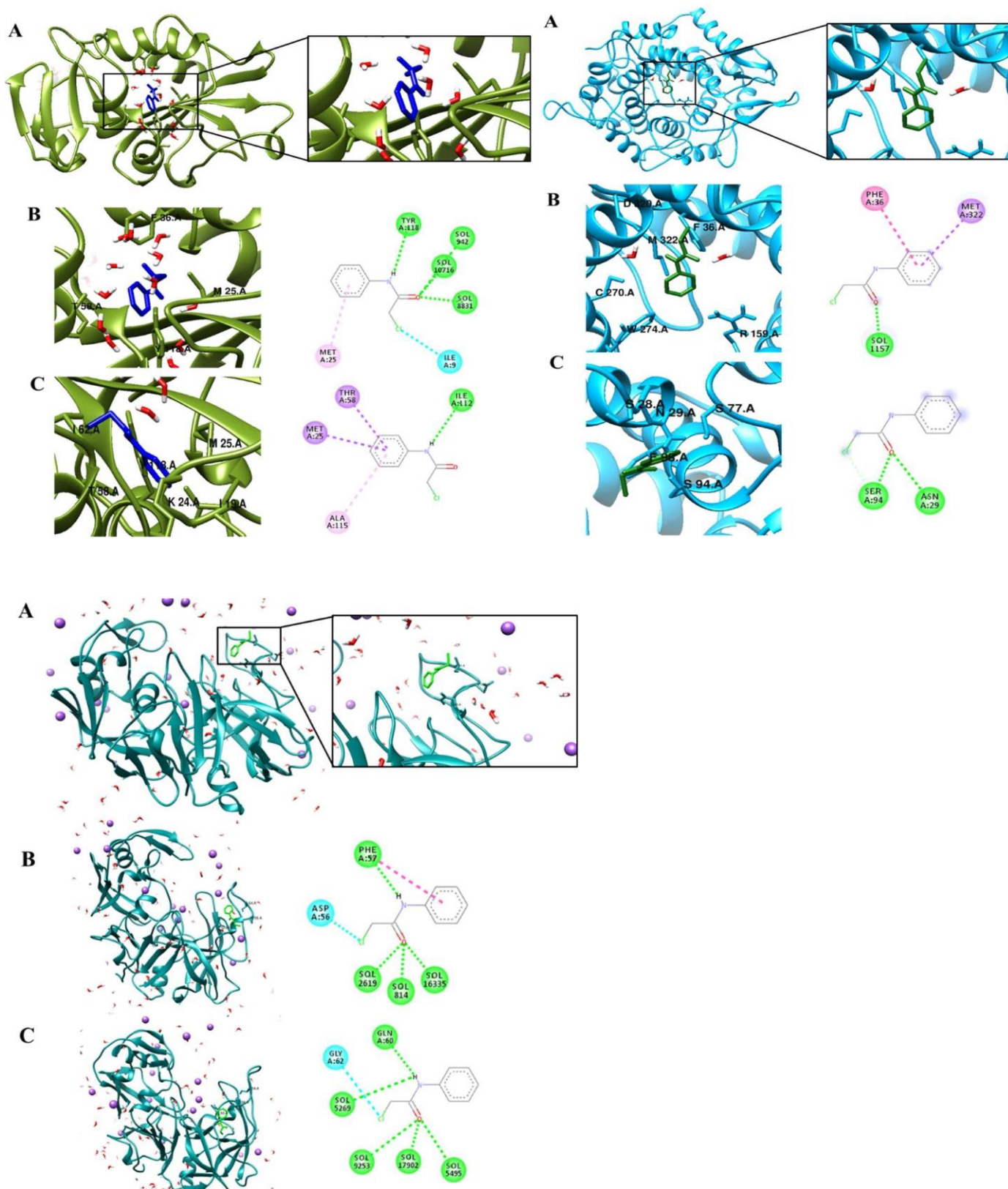


Figura 29: Simulações de dinâmica molecular do complexo DHFR-A1Cl, GGTase-A1Cl e SAP-2-A1Cl (A) em 200 ps (b) e 600 ps (c), respectivamente.



Em verde estão destacadas ligações de hidrogênio com o solvente (SOL) e vários aminoácidos. Em roxo e vermelho estão destacadas interações estéricas, verde representam ligações de hidrogênio e rosa, interações hidrofóbicas.

Nas últimas décadas, estudos com alvos moleculares em *Candida* spp são cruciais para o desenvolvimento de novos medicamentos, reduzindo tempo, custos e aumentando as chances de sucesso de candidatos a medicamentos desejados. (SILVA et al., 2019). Nesse contexto, foram realizados ensaios *in silico* para análises preditivas de possíveis células-alvo, envolvidas na atividade antifúngica de A1Cl.

Atualmente, várias técnicas de modelagem molecular estão disponíveis para facilitar as tarefas de descoberta de drogas, sendo a maioria delas classificadas em abordagens baseadas em estrutura e ligantes. Métodos baseados em estrutura contam com informações derivadas do conhecimento tridimensional e seus resíduos de um alvo de interesse e permitem classificar moléculas de acordo com a complementaridade estrutural e eletrônica de ligantes para um determinado alvo (PINZI, RASTELLI, 2019).

Nesse contexto, o docking molecular está entre um dos métodos *in silico* baseados em estruturas mais conhecidas e bem-sucedidas, realizado pela primeira previsão da orientação molecular de um ligante dentro de um receptor e, em seguida, estimando sua complementariedade por meio do uso de uma função de pontuação (PINZI, RASTELLI, 2019). Dado o potencial oferecido pelas previsões, incluindo a dinâmica molecular, esforços crescentes têm sido direcionados para explorar o espaço conformacional dos alvos, ligantes e complexos ligante-alvo investigados e, assim, descrever melhor o comportamento dinâmico com prospecção de futuros medicamentos.

Na via metabólica do folato para biossíntese de timidina (precursor da replicação do DNA), o papel do DHFR é bem estabelecido, com a ajuda do NADPH a captação celular de ácido fólico é regulada por meio de um mecanismo de transporte especializado seguido por sua conversão pela dihidrofolato redutase (DHFR) em tetrahidrofolato ativado (THF), essenciais para sobrevivência celular fúngica (SANAD et al., 2022). Visar a via biossintética do folato de microrganismos patogênicos, desenvolvendo um antifolato adequado, é uma abordagem promissora, altamente bem-sucedida no desenvolvimento de diferentes tipos de terapias antimicrobianas. Portanto, estudos computacionais projetados para avaliar a farmacologia da via metabólica do folato levam à exploração da molécula com resultados farmacológicos desejados (MUJWAR; TRIPATHI, 2022).

Nossos resultados mostraram que A1Cl inibiu o crescimento fúngico e estruturas de virulência, um processo fúngico essencial para acometimento e severidade de oncomicoses. Relatos em literatura, mostram que os inibidores de DHFR são amplamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas, bacterianas, micobacterianas e contra a malária e outras infecções por protozoários, porque geram matérias-primas essenciais para replicação de DNA

e síntese de proliferação celular (SANAD et al., 2021) (Figura 30).

Conforme achados de Whitlow (1997), os inibidores de DHFR interagem com aminoácidos Ile8, Ile9, Val10, Ala11, Met31, Glu32 e Phe36, confirmando a viabilidade de inibição de A1Cl com o local alvo (Figura 29).

Além disso, foi realizado o RMSD para avaliar a dinâmica de resíduo e o grau de flexibilidade do ligante complexo ao sítio ativo de CaDHFR na presença do solvente. E foi evidenciado que o RMSD do complexo CaDHFR-A1Cl revelou estabilidade em torno de 2–3 ns e manteve sua estabilidade acima de 10 ns, sugerindo melhor estabilidade de ligação do que o ligante (Figura 27). Para o RMSF de DHFR complexada ao composto A1Cl, observamos interações semelhantes às pesquisadas no *docking* após simulações dinâmicas em tempos de 200 e 600 ps. Como o RMSF foi inferior a 0,3 nm, pode-se inferir que A1Cl permaneceu no sítio ativo mesmo sob a influência de solventes e flexibilidade estrutural.

A GGTase-I é enzima heterodimérica de zinco que desempenha um papel crítico na integridade da parede celular fúngica e na morfogênese. Além disso, possui baixa similaridade de aminoácidos (30%) com a isoforma humana (SUN et al., 2020). Desta forma, exploramos o papel da GGTase-I na atividade antifúngica de A1Cl. No entanto, com base nos resultados da predição molecular, a inibição desta enzima possivelmente não está envolvida no mecanismo de ação de A1Cl contra espécies de *Candida*.

A patogênese de *Candida* spp. é atribuída a vários fatores, como adesão, transição morfológica, invasão dos tecidos do hospedeiro secreção de enzimas hidrolíticas (aspartil proteases secretadas), formação de biofilme e apresentação de antígenos. Polimorfismo, especialmente na capacidade de formar hifas, e fenótipo de comutação, também são propriedades particulares de *Candida* spp. que podem contribuir para a virulência. E que falhas metabólicas em proteínas associadas à virulência, incluindo Sap2, resulta na formação de biofilmes defeituosos (AHMEDI et al., 2022).

Das enzimas envolvidas na invasão ao tecido hospedeiro, as atividades de proteinase aspartica secretada-2 (SAP-2), são essenciais como um fator de virulência e, portanto, oferece um alvo potencial para intervenção terapêutica em infecções envolvendo espécies *Candida*.

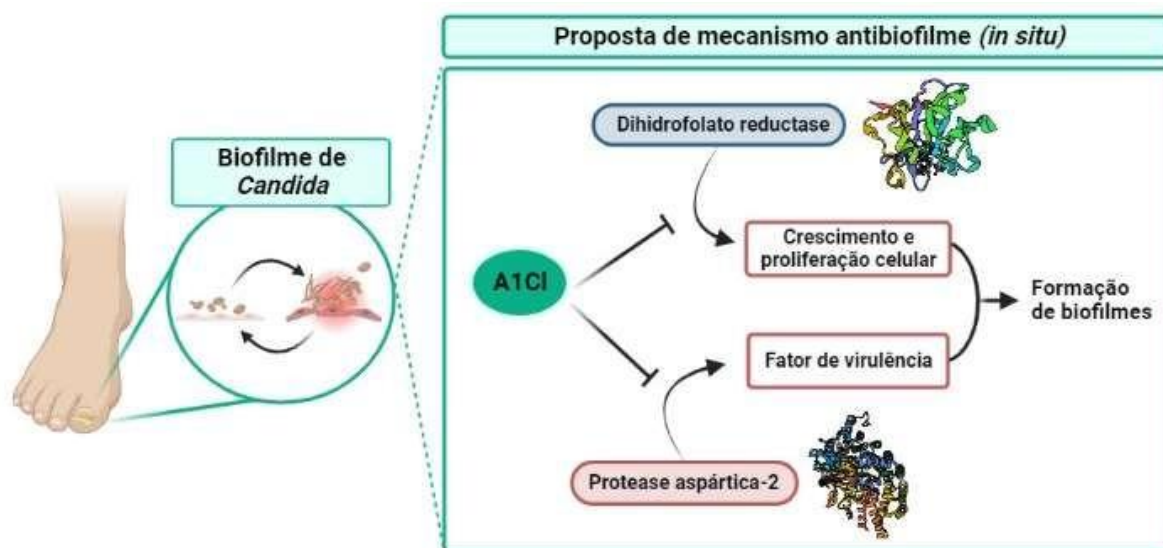
Os biofilmes formados por fungos patogênicos, particularmente de *Candida*, são altamente montados em células epiteliais e tecidos, o que causa o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Estudos recentes, indicam que SAPs foram considerados como fatores importantes para a formação de biofilme. Além disso, é relatado que a produção de SAPs melhorou a exposição de biofilmes de *C. albicans* a concentrações subinibitórias de fluconazol

(LI et al., 2020).

Sabe-se que a primeira classe de inibidores de SAP2 foi identificada por triagem virtual de base de dados SPECS (DONG et al., 2018). Desta forma, há uma necessidade urgente de projetar inibidores seletivos para SAP2, que possam ser usados como moléculas sintéticas, para explorar funções biológicas, farmacológicas e validação de alvos potenciais com descoberta de novos agentes antifúngicos, bem como levar a novas categorias terapêuticas com novos medicamentos (LI et al., 2020; BU et al., 2022).

Em nossos estudos, foi observado que A1Cl apresentou resultados de ligação a SAP-2, superiores ao fluconazol e ligante PDB. Além do mais, é importante ressaltar que a interação de inibidores de SAP2, com aminoácidos Ser36, Asn131, Glu193, Arg195, Tyr225, inibiu significativamente a formação e a filamentação do biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azóis (LI et al., 2020), o que pode ser evidenciado ação de inibição de A1Cl no alvo analisado (Figura 30).

Figura 30: Descrição de alvos moleculares de A1Cl para mecanismos antibiofilmes.



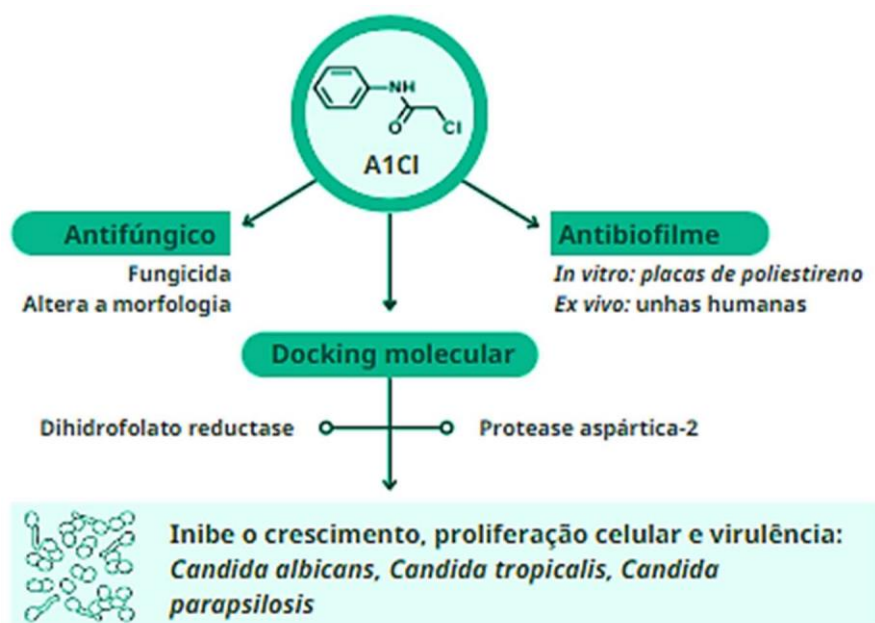
Fonte: Autoria própria (2023).

Conclusão

7.0 CONCLUSÃO

As investigações desenvolvidas nessa pesquisa contribuem para os estudos de atividade antifúngica de 2-Cloro-*N*-fenilacetamida, com ênfase em atividades contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Com base em nossos resultados pode-se sugerir que:

- A1Cl possui efeito antifúngico;
- Seus efeitos antifúngicos estão correlacionados na redução de fatores de virulência;
- Seus mecanismos de atividade antifúngica não envolvem parede celular e a membrana plasmática;
- A associação de A1Cl com fluconazol possui efeito de indiferença para sua atividade antifúngica;
- Possui atividade antibiofilme em modelos *in vitro* e *ex vivo* (fragmentos de unhas humanas).
- Inibição das enzimas Dihidrofolato reductase e Protease aspártica-2 envolvidas em síntese de material genético, proliferação celular, invasão em tecidos e formação de biofilmes.



Perspectivas

8.0 PERSPECTIVAS

Considerando que AlCl apresentou resultados promissores frente à atividade antifúngica propõem-se uma continuidade dos estudos com essa substância. Para isso, se faz necessário:

- Realizar ensaios de danos oxidativos-metabólicos para explicar os efeitos fungicidas,
- Realizar os estudos de toxicidade *in vitro* e em modelos animais;
- Realizar estudos de toxicidade pré-clínica
- Realizar estudos de formulação e ensaios pré-clínicos tópicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, p. 19-25, 2015.
- AGGARWAL, R. et al. Onychomycosis: Novel strategies for treatment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101774, 2020.
- AHAMAD, I. et al. Antibiofilm activities of biogenic silver nanoparticles against *Candida albicans*. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 4093, 2022.
- AHANGARKANI, F. et al. Indifferent effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) combined with fluconazole against multidrug-resistant *Candida auris*. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 3, p. 26, 2019.
- AHIRWAR, S. et al. Rise of superficial mycoses: A clinicoepidemiological study among the patients attending tertiary health care centre in north India. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 303-306, 2018.
- AHMED, M. Z. et al. Antifungal Drugs: Mechanism of Action and Resistance. In: **Biochemistry of Drug Resistance**. Springer, Cham, 2021. p. 143-165.
- AHMEDI, S. et al. Limoneno inibe características associadas à virulência em *Candida albicans*: estudos *in vitro* e *in silico*. *Phytomedicine Plus*, v. 2, n. 3, pág. 100285, 2022.
- AKOLKAR, Satish V. et al. New N-phenylacetamide-linked 1, 2, 3-triazole-tethered coumarin conjugates: Synthesis, bioevaluation, and molecular docking study. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 11, p. 2000164, 2020.
- ALABI, P. E. et al. Small Molecules Restore Azole Activity Against Drug-Tolerant and Drug-Resistant *Candida* Isolates. **bioRxiv**, 2022.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022.
- ALVES, D. al. Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5969, 2020.
- ALVES, D. N. et al. Breakpoints for the classification of anti-*Candida* compounds in antifungal screening. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
- ANDRÉS, T-S; ALEXANDRO, B. *Candida* onychomycosis: an old problem in modern times. **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, n. 3, p. 209-216, 2020.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 3, p. 445-451, 2017.

- ARIF, A. et al. Evaluation of Anti-inflammatory, Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitory Potential of N-(2-hydroxy phenyl) Acetamide. **Pak-Euro Journal of Medical and Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 309-318, 2022.
- ASCHALE, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, p. 1437-1441, 2012.
- ATAÍDES, F. S. (2010). Isolamento, identificação e suscetibilidade in vitro de fungos causadores de onicomicose. **Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública** -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 71.
- ATANASOV, A. G. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; MERIGHI, M.; SMITH, R.; NARASIMHAN, G.; LORY, S.; MATHEE, K. The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e34067, 2012.
- 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, 2016.
- BARBIERI, D. D. S. A. V. (2014). **Variabilidade genética e produção de biofilme in vitro por *Streptococcus mutans* em associação com leveduras do gênero *Candida***. Tese de doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p. 126.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2010.
- BERNSTEIN, F. C. et al. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, n. 3, p. 535-542, 1977.
- BERTO, C. et al. Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada. **Revista Uningá**, v. 55, n. 3, p. 52-71. 2018.
- BEUSCHER, T. L.; KELECHI, T. J. Onychomycosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing**, v. 46, n. 4, 333-335. 2019.
- BLAKEMORE, D. C. et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. **Nature Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 383-394. 2018

- BOHNER, F. et al. The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2022.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- BRAVO, H. R. et al. Chemical basis for the antimicrobial activity of acetanilides. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 48, n. 4, p. 27-30, 2003.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n.5, p. 701-708. 2013.
- BU, Qing-Ru. et al. Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 2951, 2022.
- CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+1 does not equal 2. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335. 2001.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.
- CANESCHI, C. A. et al. *In vitro* antifungal activity of organic compounds derived from amino alcohols against onychomycosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 476-482.2017.
- CAVALCANTE, A. A. (2017). **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha spicata* sobre cepas de *Candida* não albicans**. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 44.
- CHIMENTO, A. et al. A phenylacetamide resveratrol derivative exerts inhibitory effects on breast cancer cell growth. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 10, p. 5255, 2021.
- CLEELAND R, SQUIRES E. Evalution of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians& Wilkins; 1991: 739-88.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. **CLSI document M27-A3 andSupplement S n. 3**, 2017.
- 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. C. G. et al. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107352, 2019.

CURTO, M. Á. et al. Natural products targeting the synthesis of β (1, 3) - D-glucan and chitin of the fungal cell wall. Existing drugs and recent findings. **Phytomedicine**, v. 88, p. 153556, 2021.

DA SILVA, A. K. F. Infecções urinárias nosocomiais causada por fungo do gênero *candida*: uma revisão. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n.1, p. 45-57. 2014.

DA SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n. 3, p. 49-66. 2016.

DA SILVA FAY, V. et al. Estudo de 12 anos sobre infecções fúngicas no Rio Grande do Sul, Sul do Brasil. **Revista Iberoamericana de Micología** , v. 36, n. 2, pág. 55-60, 2019.

DALMAU, L. M. Remarques sur la technique mycologique. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee**, v. 7, n. 6, p. 536-545, 1929.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F. C. et al. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v, 50, n. 4, 969-978. 2019.

DE BRUYNE, S. et al. Infrared spectroscopy as a novel tool to diagnose onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 180, n. 3, 637-646. 2019.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-23. 2018.

DE SOUZA COSTA, P. et al. Relevant insights into onychomycosis pathogenesis related to the effectiveness topical treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105640, 2022.

DE SOUZA, R. O. et al. A retrosynthesis approach for biocatalysis in organic synthesis. **Chemistry-A European Journal**, v. 23, n. 50, p. 12040-12063. 2017.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**. v. 74, n. 1-2, p. 101–109, 2002

DELMA, F. Z. et al. Molecular mechanisms of 5-Fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 909, 2021.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S. Non albicans *Candida* species: a review of epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Pravara Medical Review**, v. 7, n. 3, p. 7-15. 2015.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S. Why *Candida* species have emerged as important nosocomial pathogens. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 533-545.2016.

DONG, G. et al. Novel non-peptidic small molecule inhibitors of secreted aspartic protease 2 (SAP2) for the treatment of resistant fungal infections. **Chemical Communications**, v. 54, n. 96, p. 13535-13538, 2018.

DOUGLAS, L. M.; KONOPKA, J. B. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 178-191, 2016.

DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST. **Clinical breakpoints**, 2017.

EL-GANINY, A. M. et al. Repurposing pantoprazole and haloperidol as efflux pump inhibitors in azole resistant clinical *Candida albicans* and non-albicans isolates. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 30, n. 3, p. 245-255, 2022.

EL-HOUSSAINI, H. H. et al. Influence of subinhibitory antifungal concentrations on extracellular hydrolases and biofilm production by *Candida albicans* recovered from Egyptian patients. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

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.

ENRÍQUEZ, G.V. **A Trajetória Tecnológica dos Produtos Naturais e Biotecnológicos Derivados na Amazônia**. Belém: UFPA. 2001.

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

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2008.

FALOTICO, J. M.; LIPNER, S. R. Updated perspectives on the diagnosis and management of onychomycosis. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 1933-1957, 2022.

FENG, X. et al. Molecular identification of *Candida* species isolated from onychomycosis in Shanghai, China. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 365-371. 2015.

FENG, X.; XIONG, X. RAN, Y. Efficacy and tolerability of amorolfine 5% nail lacquer in

combination with systemic antifungal agents for onychomycosis: A meta analysis and systematic review. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 3, p.1-6. 2017.

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.

FIOŁKA, M. J. et al. *Candida albicans* cell wall as a target of action for the protein–carbohydrate fraction from coelomic fluid of *Dendrobaena veneta*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2020.

FLORES, F. C.; BECK, R. C.; DA SILVA, C. D. B. Essential oils for treatment for onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 9-15. 2016.

FLORES-GAVILÁN, P.; TOUSSAINT-CAIRE, S.; ARENAS, R.. Onychomycosis: Role of Histopathology. In **Onychomycosis** (pp. 123-129). Springer, Cham: Elsevier. 2017.

FREEDMAN, J. B.; TOSTI, A. Distal Subungual Onychomycosis. In **Onychomycosis** (pp. 21-34). Springer, Cham: Elsevier. 2017.

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

GINTER-HANSELMAYER, G.; NENOFF, P. Clinically Relevant Mycoses Dermatofomycoses. In **Clinically Relevant Mycoses** (pp. 145-176). Springer, Cham: Elsevier. 2019.

GLINOS, G.; TOSTI, A. (2017). Proximal Subungual Onychomycosis. In **Onychomycosis** (pp. 45-55). Springer, Cham: Elsevier.

GORTHI, L. V. Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). In **Fungal Infections of the Central Nervous System** (pp. 23-30). Springer, Cham: Elsevier. 2019.

GOW, N. A.; LATGE, J.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **The Fungal kingdom**, p. 267-292, 2017.

GROVER, C.; VOHRA, S. Superficial fungal infections. **Comprehensive Approach to Infections in Dermatology**, v. 1, p. 85-115, 2016.

GUPTA, A. K. et al. (2020). Onychomycosis: a review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 1-50.

GUPTA, A. K. et al. A practical guide to curing onychomycosis: how to maximize cure at the patient, organism, treatment, and environmental level. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 20, n. 1, p. 123-133, 2019.

GUPTA, A. K. et al. A practical guide to curing onychomycosis: how to maximize cure at the patient, organism, treatment, and environmental level. **American journal of clinical dermatology**, v. 20, n. 1, p. 123-133, 2019.

GUPTA, A. K. et al. Monotherapy for toenail onychomycosis: a systematic review and network meta-analysis. **British Journal of Dermatology**, 2018.

GUPTA, A. K. et al. Nondermatophyte mould onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 35, n. 8, p. 1628-1641, 2021.

GUPTA, A. K. et al. Onychomycosis: Clinical Aspects. In: **Scher and Daniel's Nails**. Springer, Cham, 2018. p. 153-159.

GUPTA, A. K. et al. Possible role of trichophytin antigen in inducing impaired immunological clearance of fungus in onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3-4, p. 247-251. 2016.

GUPTA, A. K. et al. Strategies for the enhancement of nail plate permeation of drugs to treat onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2022.

GUPTA, A. K. et al. The growing problem of antifungal resistance in onychomycosis and other superficial mycoses. **American journal of clinical dermatology**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2021.

GUPTA, A. K. et al. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241-1246, 2016.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 6, p. 353-367. 2008.

GUPTA, A. K.; FOOLEY, K. A. Evidence for biofilms in onychomycosis. **Giornale italiano didermatologia e venereologia: organoufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, v. 154, n. 1, p. 50-55. 2018.

GUPTA, A. K.; MACLEOD, M. A.; TOSTI, A. (2018). Onychomycosis: Clinical Aspects. In **Scher and Daniel's Nails** (pp. 153-159). Springer, Cham: Elsevier.

GUPTA, A. K.; STUDHOLME, C. Novel investigational therapies for onychomycosis: an update. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 25, n. 3, p. 297-305. 2016.

GUPTA, A. K.; VENKATARAMAN, M. Antifungal resistance in superficial mycoses. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 33, n. 4, p. 1888-1895, 2022.

GUPTA, A. K.; VENKATARAMAN, Maanasa; QUINLAN, Emma M. Onychomycosis in the Twenty-First Century: An Update on Epidemiology and Diagnosis. In: **Dermatophytes and Dermatophytoses**. Springer, Cham, 2021. p. 41-64.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. (2017). Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539.

GUPTA, R. K.; GUPTA, P. Opportunistic fungal infections. In **Pathology of Opportunistic Infections** (pp. 53-130). Springer, Cham: Elsevier. 2017.

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

HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96, 2011.

HAFIRASSOU, A. Z. et al. Utilidade de técnicas baseadas em PCR em tempo real para a identificação de espécies causadoras de onicomicose. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 638-644, 2017.

HALVAEE, S. et al. A mycological and molecular epidemiologic study on onychomycosis and determination *in vitro* susceptibilities of isolated fungal strains to conventional and new antifungals. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 693522, 2021.

HARIKRISHNAN, P. et al. Thidiazuron, a phenyl-urea cytokinin, inhibits ergosterol synthesis and attenuates biofilm formation of *Candida albicans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1-14, 2022.

HAY, R. J. (2020). Superficial mycoses. In **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases** (pp. 648-652). Content Repository Only.

HAY, R. Superficial fungal infections. **Medicine**, v. 45, n. 11, p. 707-710. 2017./

HEREDERO-BERMEJO, I. et al. *In Vitro* Activity of Carbosilane Cationic Dendritic Molecules on Prevention and Treatment of *Candida albicans* Biofilms. **Pharmaceutics**, v.12, n. 10, p. 918, 2020.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

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

HOSSAIN, C. M. et al. Antifungals and Drug Resistance. *Encyclopedia*, v. 2, n. 4, p. 1722-1737, 2022.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in*

vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

JELLINEK, N. J. Onychomycosis: The Most Common Misdiagnosis in Nail Disease. **Dermatology News**, p. 11. 2019.

JIANG, L. et al. Honokiol kills *Candida albicans* through ROS accumulation and cell membrane destruction. **Acta Microbiologica Sinica**. v. 58, n. 3, p. 511-519, 2018.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination Antifungal Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KAMLI, M. R. et al. *Beta vulgaris* assisted fabrication of novel Ag-Cu bimetallic nanoparticles for growth inhibition and virulence in *Candida albicans*. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1957, 2021.

KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

KHAN, F. et al. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. **Biofouling**, v. 37, n. 6, p. 626-655, 2021.

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

KOLACZKOWSKI, M. et al. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 279-283. 2003.

KONEMAN, E. W et al. **Diagnostic Microbiology**. Texto Atlas. Editora médica Panamericana 2ed. 1993. p. 452-485.

KRISHNASAMY, L. et al. Molecular Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 12, n. 9, 2018.

KSIEZOPOLSKA, E. et al. Narrow mutational signatures drive acquisition of multidrug resistance in the fungal pathogen *Candida glabrata*. **Current Biology**, v. 31, n. 23, p. 5314-5326, 2021.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico, São Paulo, 9ª ed. Sarvier: São Paulo, 2001.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.

LEUNG, A. K. et al . Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on**

Inflammation & Allergy Drug Discovery, v. 14, n. 1, p. 32-45. 2020.

LI, C. et al. Targeting fungal virulence factor by small molecules: Structure-based discovery of novel secreted aspartic protease 2 (SAP2) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 201, p. 1-36, 2020.

LIONAKIS, M. S.; EDWARDS JR, J. E. ***Candida Species. Part III Infectious Diseases and Their Etiologic Agents.*** (pp. 3087-3102). 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2015.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 3, p. 3-26. 2001.

LIPNER, S. R. et al. Routine and Emerging Techniques in Onychomycosis Diagnosis. **Onychomycosis diagnosis and effective management**, John Wiley & Sons. 2018.

LIPNER, S.R; SCHER, R. K. Part I: Onychomycosis: clinical overview and diagnosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 835-851, 2019.

LIU, G. et al. Synthesis and Antifungal Activities of Biquinazoline Diselenides Compounds. **Afinidad**, v. 76, n. 586, 2019.

LODDER, J.; KREGER VAN-RIJ, N. J. W. The Yeasts. A Taxonomic Study, Amsterdam, 1952. **The Yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam, 1970.

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. A particularidade de ser um fungo - I. Constituintes celulares. **Revista Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-27. 2006.

LOHSE, M. et al. Combination of antifungal drugs and protease inhibitors prevent *Candida albicans* biofilm formation and disrupt mature biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1027, 2020.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v.166, n. 6, p. 369-383, 2008.

MARTINS, F. J. et al. Atividade antifúngica de compostos derivados do ácido cinâmico no tratamento da onicomicose. 2016.

MAYSER, P.; GRÄSER, Y. (2019). Superficial fungal infections. **Harper's Textbook of Pediatric Dermatology**, p. 527-559.

MCCARTHY, M. et al. Amphotericin B: polyene resistance mechanisms. In: **Antimicrobial**

Drug Resistance. Springer, Cham, 2017. p. 387-395.

MLACKER, S., TOSTI, A. (2017). White superficial onychomycosis. In **Onychomycosis** (pp. 35-44). Springer, Cham: Elsevier.

MOHANTY, P. et al. Total dystrophic onychomycosis due to *Syncephalastrum racemosum*—A rare cause and its novel treatment option. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 10, n. 2, p. 171. 2019.

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

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOORE, D. et al. **21st century guidebook to fungi**. Cambridge University Press, 2020.

MOOSA, M. Y. S. et al. Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 161-167, 2004.

MOREIRA, A.C.P.; LIMA, E.O, WANDERLEY, P.A.; CARMO, E.S.; SOUZA, E.S. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptissuaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n.1, p. 28-33, 2010.

MORENO, L. S. S. et al. Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants as new biocompatible antifungal agents and their synergistic effect with Amphotericin B against fluconazole-resistant *Candida* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 207, p. 112017, 2021.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60. 2000.

MUJWAR, S.; TRIPATHI, A. Repurposing benzobromarone as antifolate to develop novel antifungal therapy for *Candida albicans*. **Journal of Molecular Modeling**, v. 28, n. 7, p. 1-9, 2022.

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

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 52, p. 1. 2003.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. **Antifungal Agents: Mechanisms of Action. Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

ODIBA, A. S. et al. A new variant of mutational and polymorphic signatures in the ERG11 gene of fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Infection and Drug Resistance**, p. 3111-3133, 2022.

OLIVEIRA, A. J. M. S. **Avaliação da atividade antifúngica de amidas derivadas do ácido 3,4,5-trimetóxi-cinâmico frente a espécies de *Candida***. 2016. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

OLIVEIRA, F. F. M. et al. Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, p. 103368, 2020.

OLIVEIRA, L. B. S. **Potencial antimicrobiano e mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. p. 91. 2015.

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

OTAŠEVIĆ, S. et al. A prevalência de onicomicose por *Candida* no sudeste da Sérvia de 2011 a 2015. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 167-172, 2016.

OTTILIE, S. et al. Two inhibitors of yeast plasma membrane ATPase 1 (Sc Pma1p): toward the development of novel antifungal therapies. **Journal of Informatics**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2018.

PARMAR, K. A.; PATEL, R. K. An Efficient Synthesis and Biological Properties of 2-[(5-Methoxy-1H-Benzimidazol-2-yl) Sulfanyl]-N-Phenylacetamide Motief. **International Journal of Science and Research**, v. 4, n. 3, p. 1159-1164, 2015.

PAUL, S. et al. Mechanisms of azole antifungal resistance in clinical isolates of *Candida tropicalis*. **PLoS One**, v. 17, n. 7, p. e0269721, 2022.

PEMOVSKA, T.; BIGENZAHN, J. W.; SUPERTI-FURGA, G. Recent advances in combinatorial drug screening and synergy scoring. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 42, p. 102-110, 2018.

PEREIRA, C. Q. M. **Identificação de espécies de fungos causadores de onicomicose em idosos institucionalizados no município de São Bernardo de Campo**. 2012. 87 f. Monografia (Dissertação de Mestrado). Programa de Dermatologia, Faculdade de Medicina

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PEREIRA, F. O. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 313-326, 2021.

PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PEREIRA, F. 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, 2015.

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 657-667. 2010.

PEREZ-CASTILLO, Y. et al. Antifungal Activity of N-(4-Halobenzyl) amides against *Candida* spp. and Molecular Modeling Studies. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 1, p. 419, 2021.

PETROKILIDOU, C. et al. Emerging Optical Techniques for the Diagnosis of Onychomycosis. **Applied Sciences**, v. 10, n. 7, p. 1-11. 2020.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PIRACCINI, B. M.; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: a review. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 1, p. 30-43. 2015.

PIRACCINI, B. M.; STARACE, M. (2018). Nail Disorders. In **Atlas of Pediatric Dermatoscopy** (pp. 175-194). Springer, Cham: Elsevier.

PONDE, N. O. et al. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMESH, S.; SATISH, A. S.; LEE, J. 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.

RANGEL, M. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v.35, p.305-309. 1997.

RASOOLI, I. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by

essential oil from *Thymus eriocalyx* an Thimuxx por lock. **Food Control**, v. 17, n.5, p. 359-364. 2006.

REINEL, D. Non-dermatophyte fungi in onychomycosis—Epidemiology and consequences for clinical practice. **Mycoses**, v. 64, n. 7, p. 694-700, 2021.

REX, J. H. Combination Antifungal Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

RIGOPOULOS, D.; ELEWSKI, B.; RICHERT, B. (2018). **Onychomycosis: Diagnosis and Effective Management**. John Wiley & Sons.

ROCHA, L. F. et al. Epidemiological profile of cutaneous superficial mycoses in South, Brazil. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 2, p. 133-137, 2018.

ROSEN, T.; STEIN GOLD, L F. Antifungal drugs for onychomycosis: efficacy, safety, and mechanisms of action. **Semin Cutan Med Surg**, v. 35, n.3, p. 51-55, 2016.

RUIZ, L. R. B.; CHIACCHIO, N. D. **Manual de conduta nas onicomicoses: diagnóstico e tratamento**. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Departamento de Cabelos e Unhas, p.191-201, 2006.

SAHNI, K. et al. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 9, v.3, p. 149-158. 2018.

SANAD, S. M. H. et al. Potential bacterial biofilm, MRSA, and DHFR inhibitors based on new morpholine-linked chromene-thiazole hybrids: One-pot synthesis and *in silico* study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1248, p. 131476, 2022.

SCHALLER, M. et al. Patient-reported outcomes from two randomised studies comparing once-weekly application of amorolfine 5% nail lacquer to other methods of topical treatment in distal and lateral subungual onychomycosis. **Mycoses**, v. 60, n. 12, p. 800-807, 2017.

SCHERER, K. D. G. Atividade antifúngica do óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) em agentes causadores de onicomicoses. 2017.

SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 36, 2017.

SHAH, V. V.; TOSTI, A. 2017. Endonyx Onychomycosis. In **Onychomycosis** (pp. 57-60). Springer, Cham: Elsevier.

SHARMA, J. et al. Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 17, 2019.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; T.N. MOHAMMED MUSTHAFA, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole

derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

SILVA, A. P. (2017). **Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento de terapia fotodinâmica**. Tese de Doutorado em Física Biomolecular, Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos. p. 195.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n. 3, p. 49-66. 2016.

SILVA, D. R. et al. *In silico* approaches for screening molecular targets in *Candida albicans*: A proteomic insight into drug discovery and development. *European journal of pharmacology*, v. 842, p. 64-69, 2019.

SILVA-ROCHA, W. P. et al. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 57-64. 2017.

SOUZA, L. K. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiânia, Brazil. **Mycoses**, v. 53, p. 68-71. 2009.

SOYER, Z.; ERAÇ, B. Evaluation of Antimicrobial Activities of Some 2(3H)-Benzoxazolone Derivatives. **FABAD Journal of Pharmaceutical**, v. 32, p. 167-171, 2007.

SPITZER, M. et al. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

STEPHENSON, Steven et al. The Kingdom Fungi. **Mycoagroecology**, p. 35-49. 2022

SUBROTO, E. et al. Growth of *Aspergillus fumigatus* in Biofilms in Comparison to *Candida albicans*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 48, 2022.

SULE, H., KUMURYA, A. S.; SHEMA, F. B. (2019). Candidiasis Opportunistic Mycosis within Nigeria: A Review **UMYU Journal of Microbiology Research**.v. 4, n. 1, p. 77-82.

SUN, Q. et al. Inhibiting fungal echinocandin resistance by small-molecule disruption of geranylgeranyltransferase type I activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 2019-2046, 2020.

SVETAZ, L.; AGÜERO, M. B.; ALVAREZ, S.; LUNA, L.; FERESIN, G.; DERITA, M.;

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.

TABARA, K. et al. Amorolfine vs. ciclopirox-lacquers for the treatment of onychomycosis. **Advances in Dermatology and Allergology Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 32, n. 1, p. 40. 2015.

- TAHA, E. A. et al. Therapeutic efficacy of three systemic antifungals in onychomycosis: a randomized clinical trial. **Egyptian Journal of Dermatology and Venerology**, v. 42, n. 1, p. 45, 2022.
- TAKASUKA, T. Amino acid-or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 241-245, 2000.
- TAMER, F.; YUKSEL, M. E. Onychomycosis due to mixed infection with non-dermatophyte molds and yeasts. **Our Dermatology Online**, v. 10, n. 3, p. 267-269. 2019.
- TAPIA, A.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. **Planta Medica**, v. 73, n. 10, p. 1074–1080, 2007.
- TECKTO, I.V. Computing chemistry on the web. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1497-1500. 2005.
- TEDILA, H. et al. Candidiasis and opportunistic mycosis in human. **Novel Research in Microbiology Journal**, v. 3, n. 1, p. 190-203. 2019.
- THAMPI, L. et al. Cosmetological competence of nail patches in combating onychomycosis- An approach to improve the quality of life. **Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences**, v. 12, n. 2, p. 125-131, 2021
- THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 497-519, 2010.
- THOMSEN, R; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.
- TORRES-GUERRERO, E.; ARENAS, R. (2017). *Candida* onychomycosis. In **Onychomycosis** (pp. 73-83). Springer, Cham: Elsevier.
- TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M. (2018). **Nail disorders**. 6^a ed. Italia: Elsevier.
- TREVISAN, F. **Clipping ungueal na onicomiose e sua correlação com achados de cultura**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2016.
- VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta medica**, v. 77, n. 11, p. 1168-1182, 2011.
- VILA, T. V. M. et al. A new model of in vitro fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1031-1039, 2015a.

VILA, T. V. M. et al. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1436-1449, 2015b.

WAMBAUGH, M. A. et al. Synergistic and antagonistic drug interactions in the treatment of systemic fungal infections. **Elife**, v. 9, p. e54160, 2020.

XIE, J. L. **Stress Response Pathways Regulate Drug Resistance and Morphogenesis in the Human Fungal Pathogen *Candida albicans***. 2017. 181f. Doctoral thesis (Department of Molecular Genetics). University of Toronto, Toronto, 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.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal susceptibility testing: a primer for clinicians. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2021. p. ofab444.

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.

ZACCHINO, S. Estratégias para descoberta de novos agentes antifúngicos. In: *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: argos. 2001.

ZAICA, L. A. Spices and herbs: their antimicrobial activity and it's determination. **Journal of Food Safety**. v. 9, n. 2, p. 97– 118, 1988.

ZANE, L. T. et al. Antifungal agents for onychomycosis: new treatment strategies to improve safety. **Dermatology online journal**, v. 22, n. 3, 2016.

APÊNDICES



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

Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Avaliação da Atividade Antifúngica de 2-Cloro-N-Fenilacetamida (A1CI) Contra Espécies de *Candida* de Origem Clínica

Pesquisador Responsável: Alberto Shellygton Lima/**Orientadora:** Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima/DCF/CCS/Bolsista de Produtividade em Pesquisa/CNPq.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde/UFPB: Vimos por meio deste documento, solicitar a dispensa de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Projeto: **Avaliação da Atividade Antifúngica de 2-Cloro-N-Fenilacetamida (A1CI) Contra Espécies de *Candida* de Origem Clínica**, proposto pelos pesquisadores: Alberto Shellygton Lima (Doutorando) e Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (Orientadora). A solicitação é direcionada para os participantes [falecidos][e/ou][sem possibilidades de contato (sem acompanhamento regular na instituição, sem endereço residencial válido e/ou sem contato telefônico após pelo menos três tentativas frustradas)], com base na Res. CNS 466/12 item IV.8 que contempla a dispensa do TCLE em situações de impossibilidade de obtenção do mesmo.

A dispensa para o uso de TCLE está sendo solicitada porque se fundamenta como um estudo observacional, qualitativo-quantitativo, analítico/descritivo que contempla o uso de dados dos resultados dos exames micológicos de pacientes portadores de infecções ungueais (onicomicoses) a partir de materiais biológicos coletados e armazenados como parte da rotina clínica de uma instituição privada do município de João Pessoa/Paraíba/Brasil. Portanto, as etapas do estudo serão realizadas sem adição de riscos aos participantes da pesquisa ou

prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

O pesquisador, orientador e demais colaboradores envolvidos no Projeto em questão se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as Diretrizes e Normas Regulamentadoras descritas na Resolução CNS Nº 466/12, e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

João Pessoa, 13 de Agosto de 2019.

Pesquisador: Alberto Shellygton Lima

Ciente: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (Orientadora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Prezado (a) participante,

Esta pesquisa que tem como título **Avaliação da atividade antifúngica de 2-cloro-N-fenilacetamida (A1Cl) contra espécies de *Candida* de origem clínica** está sendo desenvolvida pelo Laboratório de Pesquisa de Atividade Antimicrobiana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, sob orientação da Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

Esta pesquisa tem por objetivo fazer um estudo *ex-vivo* referente a capacidade de espécies do gênero *Candida* spp. infectar fragmentos de unhas por meio de modelos experimentais *in vitro*. Os dados reunidos serão utilizados na elaboração da Tese de Alberto Shellygton Lima, como cumprimento de uma das metodologias da pesquisa.

Para tanto, você será solicitado a responder uma série de questões abertas e fechadas sobre o tema. Suas respostas são completamente anônimas e apenas os pesquisadores diretamente envolvidos no projeto terão acesso aos dados. Você nunca será pessoalmente identificado neste projeto de pesquisa.

Riscos mínimos são esperados no seu envolvimento nesse estudo, pois você não terá que relatar dados ou experiências que causem desconforto, assim como também não existem benefícios diretos para você. No entanto, espera-se que, através da sua participação, os pesquisadores possam compreender melhor os mecanismos pelos quais se desenvolvem este tipo de infecção fúngica.

Sua participação é totalmente voluntária. Você é livre para parar de respondê-lo em qualquer momento antes de finalizá-lo. Ao preencher o questionário, você estará de acordo que os dados sejam utilizados e analisados. Por favor, lembre-se que não existem respostas certas ou erradas. Nós estamos apenas interessados em conhecer sua opinião sincera.

Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável por esta pesquisa: Alberto Shellygton Lima (shellygton@hotmail.com) e com a orientadora da pesquisa Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, por meio do e-mail: edelolima@yahoo.com.br.

AUTORIZAÇÃO

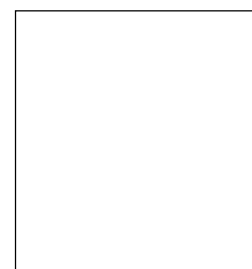
Após ter lido a descrição do estudo e ter sido informado sobre a finalidade da pesquisa **Avaliação da atividade antifúngica de 2-cloro-*N*-fenilacetamida (A1Cl) contra espécies de *Candida* de origem clínica** em indivíduos voluntários AUTORIZO a minha participação no mesmo. Compreendo que a minha participação é voluntária e que posso desistir de continuar o estudo, a qualquer momento. Autorizo também a liberação das informações obtidas para apresentação em eventos científicos e publicações, desde que a minha identidade seja protegida.

**Participante da
pesquisa**

Alberto Shellygton Lima

Endereços:

Comitê de Ética em Pesquisa



**Participante da pesquisa
Polegar direito**

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba
Campus I - Cidade Universitária - 1º andar - CEP 58051-900 - João Pessoa/PB.

(83) 32167791 - E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com