



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

BRENDA KERCYA DA SILVA FARIAS

**Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da molécula CH₃ISACN sobre
espécies de *Candida albicans* e *Candida glabrata* isoladas do trato urinário**

João Pessoa-PB

2023

BRENDA KERCYA DA SILVA FARIAS

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da molécula CH3ISACN sobre espécies de *Candida albicans* e *Candida glabrata* isoladas do trato urinário

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

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa-PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F224a Farias, Brenda Kercya da Silva.

Avaliação da atividade antifúngica in vitro da molécula CH3ISACN sobre espécies de candida albicans e candida glabrata isoladas do trato urinário / Brenda Kercya da Silva Farias. - João Pessoa, 2023.
59 f.

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

1. Farmacologia. 2. Candida. 3. Antifúngico. 4. Tratamento - Infecção fúngica. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

BRENDA KERCYA DA SILVA FARIAS

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da molécula CH3ISACN sobre espécies de *Candida albicans* e *Candida glabrata* isoladas do trato urinário

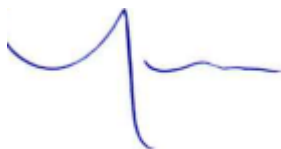
Aprovado em 16/08/23

Banca examinadora



Prof.ª. Dr.ª Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Membro interno



Prof.ª. Dr.ª Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Membro externo

Dedicatória

Aos meus avós, **Dona Lourdes** e **Seu Alfredo**, que faleceram recentemente. Obrigada por me ensinarem o caminho certo a trilhar. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, por me proporcionar saúde que me possibilita ir em busca dos meus sonhos, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida, conceder-me coragem e fortalecer-me nos dias ruins.

A minha querida orientadora, professora **Edeltrudes de Oliveira Lima**, ser humano ímpar, de coração enorme e puro. A senhora foi muito além de uma orientadora, até certas vezes pareceu ser mãe ou uma parente muito próxima, que não só eu como todos os seus alunos podiam e podem confiar. Obrigada pela oportunidade, confiança e disposição em me ensinar. A senhora pra mim é um exemplo de pesquisadora/professora/pessoa ao qual me espelho. Com dizia o cientista Isac Newton “ Gigantes são os mestres nos ombros dos quais me elevei ”.

Aos professores **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes** e **Hilzeth de Luna Freire Pessoa** membros da banca de defesa. Aos professores suplentes **Gregório Fernandes Gonçalves** e **Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz**. Obrigada por aceitarem o convite e pela contribuição em aprimorar o trabalho. É uma honra tê-los como colaboradores.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por contribuírem com minha jornada profissional.

A todos os colegas que tive durante esse percurso. **Nayana Rocha, Emanuel Melquiades, César Augusto, Junior Andrade, Rawany Gouveia e Bráulio Teixeira**. Em especial agradeço à **Nayana** e **Emanuel**, grandes amizades que fiz nessa jornada, que além de colegas, tornaram-se meus amigos e os quero levar para toda vida. A todos vocês, obrigada por todo auxílio.

A minha mãe **Maria Marlene** e minhas irmãs **Bruna** e **Jenifer**, por todo apoio e por torcer sempre por mim.

Ao meu companheiro, **Matheus Monteiro**, por me estimular a fazer a seleção de mestrado de 2021 mesmo sem ter finalizado a graduação, pois eu acreditava que não daria conta de terminar o curso e preparar-me para seleção ao mesmo tempo. Foi uma correria, mas cá estou. Obrigada por todo incentivo emocional e financeiro necessários para realização dos meus sonhos.

Aos colaboradores da química do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), pertencente ao Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB. Agradeço em especial ao professor **Claudio Gabriel Lima Junior** que sintetizou a molécula desse estudo.

Ao professor **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes** e **Victor Targino** do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) por me auxiliarem na realização do ensaio de inibição do biofilme.

À **Carol Manguiera** e **Nilmar Nincia** por todo serviço prestado com excelência ao programa.

Aos professores **Fabiana de Andrade Cavalcante** e **Josean Fachine Tavares** pelo excelente trabalho desenvolvido frente a coordenação da pós-graduação.

À **CAPES** pelo apoio financeiro e à **Universidade Federal da Paraíba** por tonar possível a realização desse sonho.

Por fim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

FARIAS, B. K S. **Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da molécula CH3ISACN sobre espécies de *Candida albicans* e *Candida glabrata* isoladas do trato urinário.** 61p. Dissertação de mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – 2023.

A infecção do trato urinário (ITU) corresponde a colonização de microrganismos e invasão de qualquer estrutura do trato geniturinário. O gênero *Candida* é um dos mais prevalentes nessas infecções, com destaque para a espécie *Candida albicans*. Entretanto, o número de casos ocasionados por outras espécies como *C. glabrata* tem crescido e representa um fator preocupante, pois apresenta resistência aos antifúngicos comumente utilizados na prática clínica. A busca por novas alternativas farmacológicas se torna um recurso importante para combater essas infecções. Nessa perspectiva, o potencial antifúngico do produto sintético derivado da isatina 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-il) acrilonitrila (CH3ISACN) foi investigado através de estudos *in vitro* contra cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. A atividade biológica da molécula foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM), ensaio de associação por meio da técnica de *Checkerboard*, estudo dos possíveis mecanismos de ação (ensaio com sorbitol 0,8M e ergosterol 400 µg/mL) e inibição da formação de biofilme. O produto teste apresentou uma notável atividade antifúngica sobre as cepas testadas, com um valor de CIM 64 µg/mL, que inibiu o crescimento de 11 (92%) das 12 cepas testadas na concentração, sendo 7 (87%) das 8 cepas de *C. albicans* e 100% de inibição para as 4 cepas de *C. glabrata*. A CFM foi definida em 128 µg/mL, apresentando efeito fungicida para a maioria das cepas testadas. A associação de CH3ISACN com fluconazol, bem como CH3ISACN com anfotericina B resultou em sinergismo para *C. albicans* e indiferença para *C. glabrata* para ambos fármacos padrões testados. Através dos ensaios de sorbitol e ergosterol, observou-se que a atividade antifúngica da molécula investigada provavelmente ocorre pela sua ação na parede celular fúngica. Por fim, a molécula apresentou inibição moderada na formação de biofilme para *C. albicans* ATCC-76485 e ausência de efeito frente *C. glabrata*. Diante dos resultados expostos, a molécula sintética pode ser considerada como possível tratamento para infecções fúngicas do trato urinário ocasionadas por espécies de *Candida*.

Palavras-chave: Isatina, atividade antifúngica, *Candida*.

ABSTRACT

FARIAS, B. K S. **Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of the CH3ISACN molecule on *Candida albicans* and *Candida glabrata* species isolated from the urinary tract.** 61p. Master's thesis in Bioactive Natural and Synthetic Products - Center for Health Sciences, Federal University of Paraiba, João Pessoa – 2023.

Urinary tract infection (UTI) corresponds to the colonization of microorganisms and invasion of any structure of the genitourinary tract. The genus *Candida* is one of the most prevalent in these infections, with emphasis on the species *Candida albicans*. However, the number of cases caused by other species such as *C. glabrata* has grown and represents a worrying factor, as it presents resistance to antifungal agents commonly used in clinical practice. The search for new pharmacological alternatives becomes an important resource to fight these infections. In this perspective, the antifungal potential of the synthetic product derived from isatin 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-yl) acrylonitrile (CH3ISACN) was investigated through *in vitro* studies against strains of *C. albicans* and *C. glabrata*. The biological activity of the molecule was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicide Concentration (MFC), association assay using the Checkerboard technique, study of possible mechanisms of action (assays with 0.8M sorbitol and ergosterol 400 µg/mL) and inhibition of biofilm formation. The test product showed remarkable antifungal activity on the strains tested, with a MIC value of 64 µg/mL, which inhibited the growth of 11 (92%) of the 12 strains tested at the concentration, with 7 (87%) of the 8 strains of *C. albicans* and 100% inhibition for the 4 strains of *C. glabrata*. The CFM was set at 128 µg/mL, showing a fungicidal effect for most strains tested. The association of CH3ISACN with fluconazole, as well as CH3ISACN with amphotericin B resulted in synergism for *C. albicans* and indifference for *C. glabrata* for both standard drugs tested. Through the sorbitol and ergosterol assays, it was observed that the antifungal activity of the investigated molecule probably occurs due to its action on the fungal cell wall. Finally, the molecule showed moderate inhibition of biofilm formation for *C. albicans* ATCC-76485 and no effect against *C. glabrata*. In view of the above results, the synthetic molecule can be considered as a possible treatment for fungal infections of the urinary tract caused by *Candida* species.

Keywords: Isatin, antifungal activity, *Candida*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da CH3ISACN.....	16
Figura 2 – Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos.....	20
Figura 3 – Principais mecanismos de resistência antifúngica em <i>Candida</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da avaliação da CIM (n=3) da CH3ISACN, fluconazol e anfotericina B frente as cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> através da Técnica de microdiluição.....	32
Tabela 2 – Resultados da avaliação de CFM (n=3) da CH3ISACN frente as cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	35
Tabela 3 – Concentração inibitória fracionária e o índice da concentração fracionária (ICIF) da associação CH3ISACN com fluconazol e anfotericina B sobre as cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	37
Tabela 4 – Concentração inibitória mínima da CH3ISACN na ausência e presença de sorbitol frente as cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	39
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima da CH3ISACN na ausência e presença de ergosterol frente as cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	40
Tabela 6 – Percentual de redução e classificação de adesões celulares in vitro no ensaio de formação de biofilme.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ITU – Infecção do Trato Urinário

CH3ISACN – 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-il) acrilonitrila

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

ATCC – American Type Culture Collection

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

LM- Laboratório de Micologia

DMSO – Dimetilsulfóxido

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

SIGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

UFC – Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Infecção do trato urinário causada pelo gênero <i>Candida</i>	16
2.2 Terapia e resistência antifúngica.....	18
2.3 Diagnóstico clínico laboratorial	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Local da pesquisa	25
4.2 Espécies fúngicas	25
4.3 Moléculas.....	25
4.4 Meios de cultura.....	26
4.5 Inóculo dos microrganismos	26
4.6 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	26
4.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM).....	26
4.7 Estudos de associação – Técnica de <i>Checkerboard</i>	27
4.8 Estudos de possíveis mecanismo de ação antifúngico.....	29
4.8.1 Ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol.....	29
4.8.2 Ação dos produtos sobre a membrana celular: Ensaio com ergosterol.....	29
4.9 Ensaio de formação de Biofilme	30
4.10 Análise estatística	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA.....	55

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* representa o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas nos seres humanos e este gênero constitui cerca de 200 diferentes espécies, sendo que aproximadamente 10% dessas estão associadas às infecções, porém, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são os agentes etiológicos mais frequentes na clínica (FURTADO *et al.*, 2018). As espécies do gênero *Candida* são microrganismos comensais e coloniza, principalmente as superfícies mucosas do trato gastrointestinal e urogenital, sem demonstrar nenhum sintoma da doença. No entanto, quando há debilidade no sistema imunológico ou desequilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro, as leveduras tendem a se torna patogênicas, podendo ocasionar manifestações mais graves como o desenvolvimento da candidíase (SOARES *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Espécies desse gênero estão presentes em vários ecossistemas e classificam-se taxonomicamente no reino Fungi. São caracterizadas por consistência cremosa, brilhantes ou opacas, com coloração branca a creme, no entanto é possível que apresentem coloração em cor marfim ao vermelho. Em nível microscópico pode variar de 5 a 8 µm de diâmetro, com células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, uma parede celular delgada que se multiplica quase sempre por brotamento (SILVA *et al.*, 2021). Além disso, o gênero possui alto polimorfismo, pois pode se apresentar na forma de leveduras, células opacas, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidósporos que contribuem para sua virulência. Dentre essas formas, as mais comuns são as leveduras, pseudohifas e hifas (NOBLE, GIANETTI, WITCHLEY, 2017).

De acordo com Rocha e colaboradores (2021), o gênero *Candida* é relatado como a terceira causa das septicemias em geral no mundo. *Candida albicans* continua sendo ao longo dos anos a espécie mais comumente encontrada nas infecções causadas pelas espécies do gênero, prevalecendo em 65,3 % das infecções ao redor do mundo. No entanto, nos dias atuais, as demais espécies apresentam percentual superior a 20% nos diagnósticos de candidíase.

A candidúria ocorre quando são encontradas leveduras do gênero *Candida* na urina e embora seja comum sua presença nessa matriz, é considerado um dilema para os pesquisadores devido à falta de total conhecimento da sua patogenicidade no trato urinário (PEMÁN, RUIZ-GAITÁN, 2018). No entanto, sabe-se que a aderência às superfícies teciduais, proteínas de choque térmico, galvanotropismo e tigmotropismo foram demonstrados e podem contribuir para a infecção do trato urinário (ITU) subsequente. Por outro lado, a profilaxia antifúngica de

rotina pode aumentar a patogenicidade das espécies e resistência a drogas antifúngicas (GHARAGHANI *et al.*, 2018).

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

A população brasileira é frequentemente acometida com tais infecções, o que acarreta em gastos para o Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, pesquisadores estimam que existam cerca de 150 milhões de casos de ITU no mundo e que os gastos com despesas no tratamento dessas infecções sejam em torno de bilhões de dólares (FLORES-MIRELES *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020).

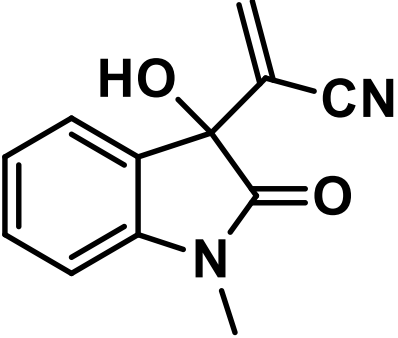
Diante disto, vale ressaltar a urgência e importância da prospecção de novos fármacos antimicrobianos na tentativa de contornar ou controlar as infecções provocadas por tais patógenos. Nessa corrida, os produtos naturais e seus derivados têm sido muito utilizados como fonte de pesquisas devido à grande diversidade de substâncias com atividade biológica (NASCIMENTO JÚNIOR *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2019). No entanto, o uso de produtos sintéticos tem crescido consideravelmente nos últimos anos em decorrência da agilidade no processamento e da capacidade de modificação das moléculas, tornando-se uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de fármacos com propriedades farmacológicas mais seguras e eficientes (KIM *et al.*, 2018).

Um desses produtos sintéticos é a molécula investigada nesse estudo, referida quimicamente como 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-il) acrilonitrila (CH₃ISACN). Tal molécula é um produto sintético derivado da isatina, amplamente distribuída em plantas e produtos naturais de origem marinha. Trata-se de uma molécula bastante utilizada como reagente para síntese de novas substâncias. Estudos demonstram que a isatina possui uma ampla gama de atividades biológicas, tais como efeito anti-inflamatório (DANTAS, 2020) antifúngica e antimicrobiana (SALEEM *et al.*, 2022; TANGADANCHU, SUI, ZHOU, 2021), antileishmania (KHATOON *et al.*, 2021), antioxidante (EGGADI *et al.*, 2016) dentre outras.

A molécula foi obtida através de reações de Morita-Baylis-Hillman (MBHR) no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A isatina tem se mostrado como agente promissor para o descobrimento de novos fármacos uma vez que tem

um baixo custo de produção e possui uma estrutura que permite a realização de modificações químicas para síntese de novas substâncias com ação em vários alvos biológicos (ANDRADE *et al.*, 2023).

Figura 1. Estrutura química da CH3ISACN

Estrutura química	Nomenclatura
	2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-il) acrilonitrila

Fonte: Autoria própria (2023).

No entanto, vale salientar que, apesar da ampla utilização e do potencial biológico apresentado pela isatina e derivados desta molécula, não há nenhuma investigação sobre o potencial antifúngico de MBHR entre derivados de isatina e ésteres acrílicos ou acrilonitrila até o momento, o que enfatiza a relevância e ineditismo desta pesquisa na contribuição para desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra estas infecções de elevada importância.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecção do trato urinário causada pelo gênero *Candida*

A infecção do trato urinário representa a colonização de microrganismos e invasão de qualquer estrutura do trato geniturinário. Nos dias atuais, comparada com a época pré-antibiotica, a morbidade já não é tão significativa devido sua alta e rápida resposta a antibióticos modernos. Tais infecções podem ser classificadas em complicadas e não complicadas, sendo as primeiras definidas como aquelas infecções em vigência de anormalidades estruturais, funcionais ou nosocomial, com maior risco de falha terapêutica (RIBEIRO, SILVA, RAMALHO, CASTOR, 2020).

Ressalta-se que a ITU é uma das causas expoentes de consultas na rotina médica, sendo apenas superada pelas infecções de origem respiratória. No Brasil, as ITUs correspondem por 8 a cada 100 consultas clínicas (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Pesquisas demonstram que *C. albicans* é a espécie mais predominante em casos de ITU ocasionadas pelo gênero. No entanto, outras espécies também têm sido cada vez mais frequente, como o envolvimento da *C. glabrata* e *C. tropicalis* (LIMA *et al.*, 2017). Esse aumento de casos por outros tipos de espécies se torna um grave problema devido à prevalência de resistência intrínseca principalmente aos fármacos azólicos, tal como o fluconazol, mais usado na prática clínica para tratar candidúria (REIS, SANTOS, ALVES, 2022).

Existem poucos estudos acerca da epidemiologia da ITU por *Candida* no Brasil, os estudos mais recentes demonstram que as ITUs por *Candida* há predominância da *C. albicans* (42,6%), *C. glabrata* (14%), *C. tropicalis* (8%) (BEHZADI, RANJBAR, 2015; LIMA *et al.*, 2017). Concordando com esses dados, um estudo realizado em pacientes com ITU em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no Rio Grande do Sul em 2021, identificou que a frequência de *C. albicans* foi de 54 casos, enquanto *C. glabrata* e *C. tropicalis* foi de 34 e 7 casos respectivamente, além de 2 casos para *C. kefyr* e 1 caso para *C. parapsilosis* (EKSI *et al.*, 2022).

Os uropatógenos habitualmente são Gram-negativos entéricos e são altamente previsíveis, facilitando o tratamento empírico. *Escherichia coli*, uma bactéria que coloniza o colón, a região perianal e o introito vaginal, é considerada um dos principais microrganismos uropatogenicos. Além desse, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Entrococcuss* e *Citrobacter* estão entre os mais comuns, como também podem ser encontrados outros microrganismos como os fungos, sendo *Candida* a mais prevalente (SABIH, LESLIE, 2022).

Um estudo realizado por Menotti e colaboradores (2019) demonstrou que na análise sobre prevalência de agentes infecciosos isolados das culturas de urina, houve um predomínio de fungos (59,03%). Em que foi observado um perfil diferente em relação as espécies de *Candida* de acordo com o sexo do paciente, uma vez que 24,31% dos agentes infecciosos eram *C. albicans*, com predomínio no sexo feminino, seguido de *C. tropicalis* com predominância masculina e *C. glabrata*. (MENOTTI *et al.*, 2019).

Alguns dos fatores de riscos para candidúria são roupa íntima apertada, uso de antibióticos, gravidez, relação sexual, deficiência imunológica, idade avançada e o sexo feminino, condizendo com os dados acima apresentados, em detrimento da prevalência no sexo

feminino e idade maior que 66 anos. Por se tratar de uma infecção bastante presente no dia a dia, pacientes da comunidade (fora do ambiente hospitalar) apresentam com um número maior de contaminações, porém, este patógeno ainda representa um número significativo de infecção hospitalar (ANDRADE, 2021).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento de ITUs por *Candida* consistem em indivíduos que possuem diabetes mellitus, uso de sondas vesicais e uso de medicamentos imunossupressores, como corticosteroides. Os cateteres rompem barreiras fisiológicas e microbiológicas e facilitam a entrada de microrganismos como *Candida*, bem como o uso de antibióticos de amplo espectro suprime a flora gastrointestinal e genital e causa a colonização do microrganismo (GAJDÁCS, *et al.*, 2019). Além desses fatores, outro que merece destaque é a admissão do paciente em ambiente de UTI. Normalmente, 20% dos pacientes hospitalizados podem se expor a candidúria ao longo de sua internação devidos aos procedimentos terapêuticos e diagnósticos invasivos (ODABASI, MERT, 2020; GHARAGHANI *et al.*, 2018;).

Vale destacar que a presença de microrganismos pode ser proveniente do ambiente hospitalar animado ou inanimado adquirido através das mãos dos profissionais de saúde que manuseiam inadequadamente o sistema de sondagem vesical ou mesmo através da infusão de produtos contaminados (MENOTTI *et al.*, 2019).

2.2 Terapia e resistência antifúngica

O tratamento disponível atualmente para ITU por *Candida* inclui os agentes triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, ravuconazol e albaconazol), as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), os polienos (anfotericina B convencional e suas formulações lipídicas) e a flucitosina (Figura 2). Além disso, pode ser feito a remoção de cateteres permanentes e correção de obstrução (BERTO *et al.*, 2018).

Em pacientes assintomáticos persistentes, quando possível, o tratamento basicamente consiste na remoção dos fatores de risco, tal como a remoção de cateteres (JACOBS *et al.*, 2018). Para os sintomáticos o tratamento é feito com os antifúngicos. O fluconazol, normalmente é o fármaco de escolha devido a sua boa concentração na urina, baixa toxicidade e baixo custo. Esse fármaco apresenta como desvantagens as interações medicamentosas, toxicidade hepática e prolongamento do intervalo QT. Por outro lado, para o pacientes assintomáticos, o tratamento é recomendado apenas para aqueles com alto risco de desenvolver candidemia ou nos quais a presença de candidúria infere infecção disseminada (ODABASI, MERT, 2020).

A ação do fluconazol ocorre por meio da inibição da enzima fúngica 14α -desmetilase, codificada pelo gene *ERG11*. Trata-se de uma enzima do citocromo P-450 responsável por catalisar a conversão do lanosterol em ergosterol. Como o ergosterol constitui uma parte crítica da membrana da célula fúngica, o fármaco inibe a síntese de ergosterol e altera a fluidez da membrana, resultando em inibição da replicação fúngica. Ademais, os azóis também inibem a transformação das leveduras em hifas e previne a respiração endógena (GOVINDARAJAN *et al.*, 2022).

Como a maioria das ITUs são causadas pela *C. albicans*, o fluconazol se torna o medicamento de escolha, porque a resistência não é tão comum a esse antifúngico. No entanto, algumas espécies apresentam resistência, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. fermentat* (PAPPAS *et al.*, 2018). Para as espécies resistentes ao fluconazol e em especial a *C. glabrata*, a anfotericina B continua sendo a droga de escolha nessas infecções, apesar de que estudos mostram que infecções por *C. glabrata* têm concentração inibitória mínima (CIM) elevada para anfotericina B. Nesses cenários, o teste de suscetibilidade antifúngica é fortemente recomendado para garantir o tratamento mais eficaz (ARENDRUP, PETTERSON, 2017).

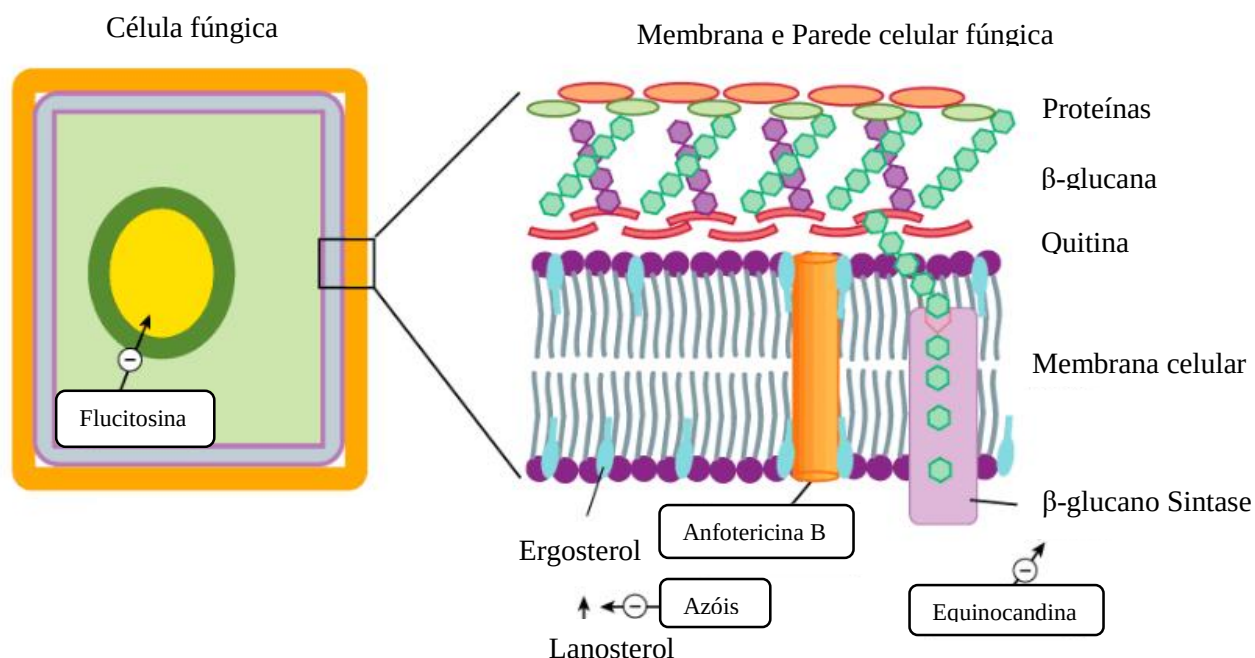
A anfotericina B e suas formulações lipídicas (dispersão coloidal, complexo lipídico e lipossomal) são uma mistura de substâncias antifúngicas derivadas de culturas de *Streptomyces*. Estes fármacos se ligam ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica e interfere na permeabilidade e nas funções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

A presença de resistência fúngica é considerada rara para esse fármaco, uma vez que o ergosterol não é codificado geneticamente e seus efeitos fungicidas não são susceptíveis ao desenvolvimento de resistência (JEAN *et al.*, 2022). No entanto, apesar da anfotericina B ser considerada um fármaco fungicida de alta eficiência, sua principal desvantagem está condicionada a fortes efeitos adversos, como a nefrotoxicidade grave e interações medicamentosas, o que necessita de cautela no seu uso, principalmente para pacientes gravemente enfermos que fazem uso de muitas classes de medicamentos (EKINCI *et al.*, 2021).

A partir da década de 1970, surgiram as equinocandinas, obtidas a partir da modificação de alguns fungos, tais como a anidulafungina, derivada de *Aspergillus nidulans*. Essas moléculas são lipopeptídeos cíclicos, que inibe a enzima β -(1,3)-glucano sintase, codificada

pelo gene *FKS1/2*, que é essencial para a síntese do β -(1,3)-D-glucano, um componente fundamental da parede celular dos fungos. Na ausência deste polímero ocasiona a ruptura da parede celular resultando em atividade fungicida especialmente em cepas de *Candida*, incluindo aquelas resistentes a antifúngicos azólicos e poliênicos (JENKS *et al.*, 2018). No entanto, as equinocandinas tais como a caspofungina, anidulafungina e micafungina não são o tratamento mais eficaz para ITU ocasionada por *Candida*, pois apresentam baixas concentrações da droga inalterada na urina. Além disso, existem poucos estudos mostrando a eficácia das equinocandinas no tratamento de infecções do trato urinário (ODABASI, MERT, 2020)

Figura 2. Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos



Antotericina B liga-se ao ergosterol na membrana alterando sua permeabilidade e provocando o extravasamento dos componentes celulares. Os azóis impedem a formação do lanosterol em ergosterol pela inibição da 14α -desmetilase. Equinocandinas inibem a enzima que sintetiza o β -(1,3)-D-glucano, presente na parede celular.

Fonte: Adaptado de Katzung, Masters, Trevor (2012).

E por último, a flucitosina, um análogo da pirimidina. Este fármaco tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de DNA do fungo causando uma aberração na sua transcrição. Penetra facilmente na célula fúngica por intermédio da citocina aminase e em seguida será convertida em 5-fluororacil, seu metabólito ativo, considerado um falso nucleotídeo. Este por sua vez, inibe a enzima timidilato sintetase, que é o componente essencial do DNA, ausente nas células eucarióticas humanas e por isso apresenta poucos efeitos colaterais (SILVA, SANCHES, BAUKEN, 2022). Devido ao seu significativo grau de resistência, a flucitosina praticamente não é utilizada em monoterapia, sendo associada normalmente com a

anfotericina. Seu espectro de ação aborda *Cryptococcus neoformans*, *Candida*, alguns fungos causadores de cromoblastomicose e algumas cepas de *Sporothrix* e *Aspergillus* (FUCHS; WANNMACHER, 2014).

O grande desafio para o tratamento com antifúngicos é o surgimento resistência. Nos últimos anos tem crescido seu desenvolvimento nas espécies do gênero *Candida* principalmente devido a sua plasticidade do genoma e aumento das taxas de recombinação mitóticas. Além dessa adaptação, várias espécies apresentam resistência intrínseca, como é o caso da *C.krusei*, *C. glabrata* e *C. auris* (DEMIRCI- DUARTE, ARIKAN-AKDAGLI, GÜLMEZ, 2021; ARENDRUP, PATTERSON, 2017).

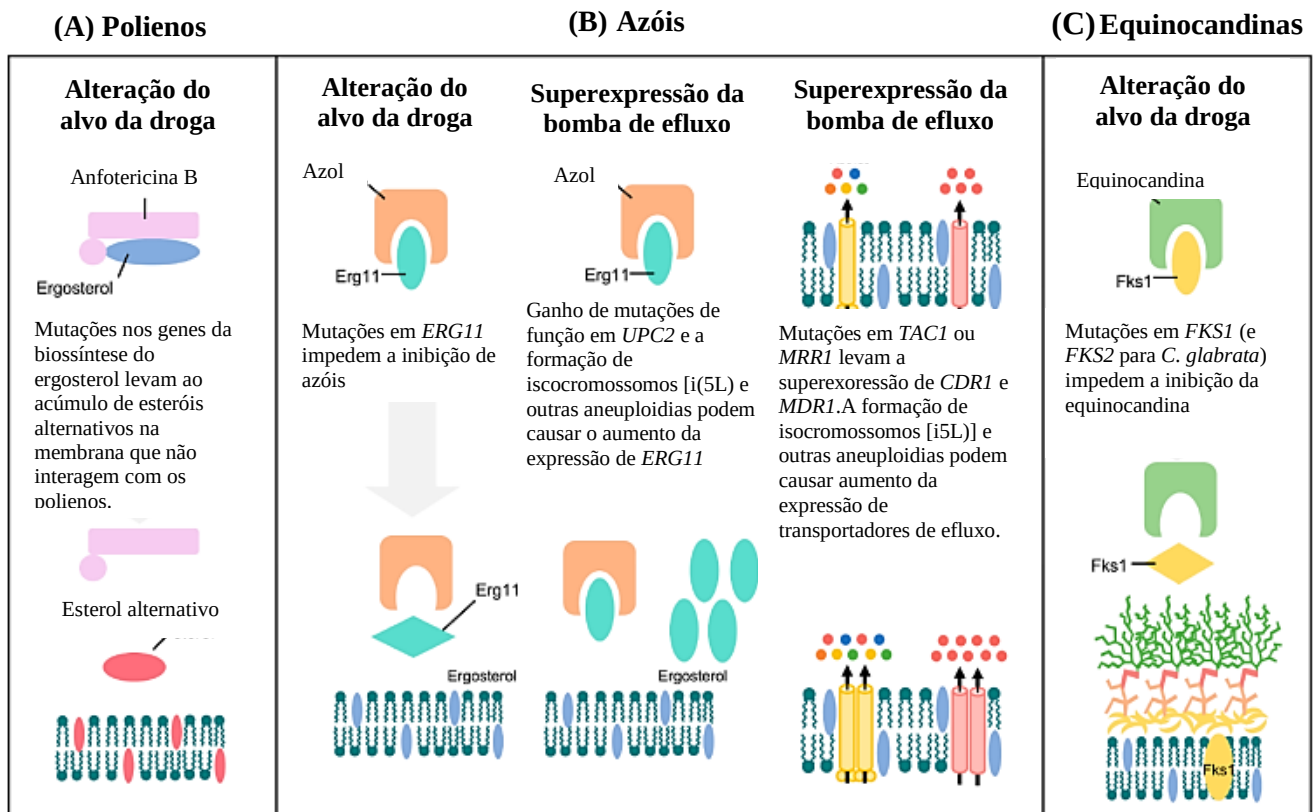
O uso frequente e profilático levou ao desenvolvimento robusto de resistência antifúngica em muitas espécies desse gênero (Figura 3). Tal surgimento envolve mecanismo genéticos e moleculares, de modo que o conhecimento desses mecanismos contribuem para orientação da melhor terapia (RUIZ-BACA *et al.*, 2021).

Dentre esses mecanismos, ocorre alteração ou superexpressão do alvo da droga, como ocorre com os azóis e as equinocandinas, por substituições de aminoácidos no gene *ERG11* e *FKS1/2*, ocasionadas por mutações. A superexpressão de *ERG11* é bastante comum em *C. albicans* e contribui para o aumento de alvos farmacológicos, diminuindo a resposta aos medicamentos (REVIE *et al.* 2018). Também pode ocorrer a hiperexpressão de bombas de efluxo, como a superfamília de transportadores ligados ao ATP (*ATP-binding cassette – ABC*) e a superfamília do facilitador majoritário (*Major facilitators superfamily – MFS*). Estas contêm dois domínios transmembranares e dois domínios nucleotídicos de ligação, utilizando a hidrólise de ATP para encaminhar os substratos através da membrana. A ABC é codificada pelos genes *CDR1* e *CDR2* (*Candida Drug Resistance*), que são regulados pelo fator de transcrição *TAC1* (*Transcriptional Activator of CDR genes*). A hiperativação do fator de transcrição *TAC1* é conferida por mutações *gain-of-function* que conseqüentemente promovem a superexpressão dos genes *CDR1* e *CDR2*. Em contraste, a resistência na família MF está relacionada pela expressão do gene *MDR1* (*Multi Drug Resistance 1*) controlado pelo fator de transcrição *MRR1* (*Multidrug Resistance Regulator 1*), que também promovem a superexpressão dos genes *CDR1* e *CDR2* (MORSCHHAUSER *et al.*, 2007).

Existem poucos relatos de resistência aos polienos, no entanto, a rara incidência é mediada por alterações enzimáticas que diminuem a afinidade do fármaco ou destroem o ergosterol da membrana por mutação nos genes *ERG2*, *ERG3* e *ERG5*, responsáveis pela sua biossíntese (ARENDRUP, PATTERSON, 2017; PRISTOV, GHANNOUM, 2019). Além

disso, a resistência também pode ocorrer por modulação de respostas ao estresse através da proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Trata-se de uma proteína responsável pela regulamentação dos processos de adaptação, crescimento celular e respostas ambientais capazes de perturbar a homeostase e impor estresse à célula fúngica. Com a inibição dessa proteína é abolida a resistência aos medicamentos antifúngicos, no entanto, tal mecanismo não está totalmente esclarecido (LEE et al., 2021; CRUNDEN; DIEZMANN, 2021).

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



(A) Resistência aos polienos é ocasionada principalmente por mutações que acarretam a depleção do ergosterol, através de mutações por perda de função nos genes da biossíntese do ergosterol, que leva à produção de esteróis alternativos, que não interagem efetivamente com os polienos e, dessa forma, não são extraídos da membrana da célula fúngica. (B) Resistência aos azólicos pode ocorrer por substituição do alvo farmacológico, hiperexpressão do alvo farmacológico e pela hiperexpressão das famílias de transportadores MF e ABC (*CR1* e *CR2*). A superexpressão do alvo da droga pode ocorrer por meio de mutações de ganho de função no gene *UPC2* ou pela formação de aneuploidias, como [i(5L)], que aumentam diretamente o número de cópias de *ERG1*. (C) Resistência às equinocandinas ocorre através da mutação do gene *FKS*.

Fonte: Adaptado de Lee *et al.*, (2021).

Ainda, vale salientar que a presença de biofilmes é um fenômeno comum em microrganismos, incluindo espécies de *Candida*. Os biofilmes podem surgir em superfícies bióticas ou abióticas e são compostos pela associação de hifas de comunidades biológicas com alto grau de organização envoltas por uma matriz polimérica composta por exopolissacarídeos (EPS). A organização de biofilmes oferecem grandes vantagens para as células fúngicas, principalmente por contribuir com o desenvolvimento de resistência, pois sequestra moléculas antifúngicas e impede sua penetração no interior do biofilme formado (BUTASSI *et al.* 2021; GINA *et al.* 2019).

2.3 Diagnóstico clínico laboratorial

O diagnóstico das infecções urinárias tendo como agentes etiológico as leveduras do gênero *Candida*, é feito primeiramente pela avaliação clínica do paciente seguido de exames laboratoriais no material biológico em que se utiliza a urina. A maioria dos pacientes com candidúria são assintomáticos e as leveduras são observadas na urina como um achado fortuito em um exame de urina e rotina ou cultura de urina. Contudo, nos indivíduos com infecção sintomática por *Candida*, os sintomas são inconfundíveis dos comparados com infecções bacterianas. Tais sintomas incluem disúria, desconforto, pielonefrite, oligúria, estrangúria (micção difícil e dolorosa) bem como podem surgir febre e calafrios (ALFOUZAN, DHAR, 2017.; ODABASI, MERT, 2020).

Infelizmente, sinais e sintomas clínicos, não são suficientes para distinguir ITUs bacteriana de fúngicas. Desse modo, tornam-se necessários os diagnósticos laboratoriais para comprovação de infecção por *Candida* no trato urinário. A técnica rotineiramente mais utilizada na maioria dos laboratórios é a cultura de urina para identificação do gênero *Candida*. Nesse caso, a urina é inoculada em meio de cultura, em que em sua maioria utiliza-se o Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio CHROMagar *Candida*, seletivo para o isolamento e diferenciação da maioria das espécies (VALENTE, LOPES, REIS, 2021).

Além disso, também verificam-se as provas de identificação, como análise microscópica para avaliar as características macro e micromorfológicas, provas fisiológicas e bioquímicas segundo os critérios estabelecidos por Hoog; Guarro (1995); Sidrim e Rocha (2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da molécula CH3ISACN sobre linhagens de *C. albicans* e *C. glabrata* isoladas do sistema urinário.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) da CH3ISACN sobre *C. albicans* e *C. glabrata*;
- Investigar possíveis efeitos sinérgicos, aditivos, antagônicos ou indiferente do produto CH3ISACN de forma individual e associado com antifúngicos licenciados fluconazol e anfotericina B;
- Avaliar os possíveis mecanismos de atividade do produto testado com ênfase nos seus efeitos sobre a parede celular e membrana plasmática fúngica;
- Verificar se o produto testado possui efeito anti-biofilme nas linhagens de *C. albicans* e *C. glabrata*.

4 METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

Os ensaios de atividade antifúngica para o desenvolvimento desse estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O ensaio para investigar a inibição de formação do biofilme microbiano foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), do Departamento de Biotecnologia (DB), do Centro de Biotecnologia (CBIOTEC), da UFPB.

4.2 Espécies fúngicas

Para o ensaio de atividade antifúngica foram utilizadas cepas padrão (ATCC – *American Type Culture Collection*) e cepas de origem clínica oriundas do trato urinário, sendo estas: *C. albicans*: ATCC-76485, LM-7, LM-44, LM-50, LM-111, LM-261, LM-300, LM-441 e *C. glabrata*: ATCC-90030, LM-18, LM-19, LM-20. Todas as cepas fúngicas pertencem ao Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DFC), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB. Para realização dos ensaios de mecanismo de ação, associação e biofilme, foram selecionadas de forma aleatória entre as quais apresentaram os menores valores de CIM, uma cepa padrão e uma clínica para cada espécie: *C. albicans* (ATCC-76485 e LM-7) e para *C. glabrata* (ATCC-90030 e LM-18).

As amostras de *Candida* foram mantidas em tubos de ensaio (15 x 150 mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose inclinado (Difco®) sob refrigeração (8°C) até o momento da realização do ensaio. As referidas leveduras estão registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGEN) sob o número AEFED60.

4.3 Moléculas

O composto CH3ISACN foi sintetizado e fornecido pelos pesquisadores Dr. Claudio Gabriel Lima Junior e seus colaboradores do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), da UFPB. Os antifúngicos licenciados utilizados nos ensaios foram: anfotericina B e fluconazol. Estas substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich®.

A molécula CH3ISACN e os antifúngicos licenciados anfotericina B e fluconazol foram pesados na concentração inicial de 1.024 µg/mL e solubilizados 150 µL (3%) de

dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de Tween 80, completando-se o volume final (q.s.p 5mL) com água destilada esterilizada de acordo com as concentrações desejadas.

A partir da concentração inicial da CH3ISACN e dos antifúngicos padrão, de 1.024 µg/mL, foi feita uma diluição em série até 0,5 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK e GREGER, 2000; PEREIRA *et al.*, 2014).

4.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para manutenção das cepas de *Candida* para os ensaios da atividade antifúngica do produto CH3ISACN foram o Ágar Sabourad Dextrose (ASD) e líquido RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France e Sigma Aldrich, respectivamente, preparados de acordo com as descrições do fabricante. Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos seguindo as recomendações dos fabricantes.

4.5 Inóculo dos microrganismos

Para preparação do inóculo, os isolados das leveduras foram semeados em meio ASD e incubadas a 35±2°C, por 24-48 horas. Logo após, as colônias dessas culturas foram suspensas em solução NaCl a 0,9% (FRASENIOS KABI Brasil Ltda/Ceará/Brasil) esterilizada e, por fim, reajustadas de acordo com o padrão do tubo nº 0,5 da escala McFarland, para obtenção de um inóculo de aproximadamente 1x10⁶ UFC/ml. (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HOLETZ *et al.* 2002).

4.6 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

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

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Cleeland e Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM da molécula foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo RPMI 1640 em placas de microtitulação para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços estéreis e com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI 1640 nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da molécula solubilizada foram dispensadas nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois (2:1), foram obtidas concentrações de 1024 até 0,5 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL das suspensões das espécies fúngicas de *Candida* nas cavidades, onde cada

coluna da placa refere-se, especificamente a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: microrganismos (RPMI + fungos), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI), para comprovação da esterilidade e controle com anfotericina B e fluconazol. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Após esse período, realizou-se a primeira leitura dos resultados. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico. Verificada como ausência de turbidez nos poços, quando em comparação com seu controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios. O produto é considerado ativo quando inibe, pelo menos, 50% dos microrganismos utilizados nos ensaios de atividade biológica (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HAFIDH *et al.*, 2011). A atividade antifúngica da molécula CH3ISACN foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 500 $\mu\text{g/mL}$ = forte atividade; 600-1600 $\mu\text{g/mL}$ = moderada atividade; acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$ = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007).

Após leitura da CIM, foi realizado o ensaio para determinação da CFM. Alíquotas de 10 μL do sobrenadante das cavidades onde foi observada a completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x 2 e CIM x 4) foram adicionadas em 100 μL de caldo RPMI contidos em novas placas de microtitulação/96 poços e incubadas por 24-48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A CFM foi considerada como sendo a menor concentração do produto teste capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios. Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade (caldo RPMI 1640) e de viabilidade das espécies microbianas (RPMI 1640 mais inóculo de cada microrganismo) (BALOUIRI, SADIKI, IBNSOUDA, 2016; NCUBE, AFOLAYAN, OKOH, 2008; SALIE, ESGLES, LENG, 1996).

Também foi avaliado o modo de ação da substância teste através da razão CFM/CIM, metodologia esta utilizada por Siddiqui *et al.*, (2013) para especificar se a natureza da molécula possui atividade funistática ($\text{CFM/CIM} > 4$) ou fungicida ($\text{CFM/CIM} \leq 4$).

4.7 Estudos de associação – Técnica de *Checkerboard*

O efeito da associação do produto teste CH3ISACN com os antifúngicos padrão de escolha (fluconazol e anfotericina B) foram determinados através da técnica de *Checkerboard* para derterminação do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF).

Para realização desse ensaio, 100 µL de RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato foram distribuídos na placa de 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (INLAB, São Paulo-SP, Brasil). Posteriormente, 50 µL da substância teste em diversas concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8) foram adicionadas no sentido vertical e 50 µL do antifúngico de escolha (anfotericina B/ fluconazol) também nas mesmas concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8), foram adicionados no sentido horizontal da microplaca. Por último, serão acrescentados 20 µL da suspensão fúngica, previamente ajustados de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland. As microplacas serão incubadas a 28°C por 72 horas, e após esse período, será feita a leitura para observar a presença ou não do crescimento fúngico visível assim como indicado pela mudança colorimétrica do meio líquido utilizado, indicando crescimento do microrganismo (WHITE *et al.*, 1996).

Todos os controles foram aplicados, com o objetivo de atestar a ausência de interferência pelos agentes emulsificantes, a esterilidade do meio de cultura utilizado e a viabilidade dos microrganismos. Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

A concentração inibitória fracionada (CIF) foi calculada para cada produto utilizado na associação, onde A representa a CH3ISACN e o B o fluconazol ou anfotericina B, conforme a equação apresentada:

$$CIF(A) = \frac{CIM \text{ (Substância A em combinação)}}{CIM \text{ (Substância A isolada)}} \text{ (eq1)}$$

$$CIF(B) = \frac{CIM \text{ (Substância B em combinação)}}{CIM \text{ (Substância B isolada)}} \text{ (eq2)}$$

A interação é calculada por outra equação (eq3) obtendo-se o índice de concentração inibitória fracionada. O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (ICIF ≤ 0,5); aditividade (ICIF > 0,5 e < 1); indiferença (ICIF ≥ 1 e < 4); ou antagonismo (ICIF ≥ 4,0) (CORREA-ROYERO *et al.*, 2010; LEWIS *et al.*, 2002).

$$ICIF = CIF \text{ (Substância A)} + CIF \text{ (Substância B)} \text{ (Eq3)}$$

4.8 Estudos de possíveis mecanismo de ação antifúngico

4.8.1 Ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol

Este método se baseia na medida dos danos que os produtos testes com atividade antifúngica produzem aos componentes da parede celular fúngica, comparando as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M. O sorbitol é um protetor osmótico, usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Caso a CH3ISACN atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele provocará lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte, como consequência ocorrerá o aumento da CIM.

A determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol, foi realizada pela microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, será adicionados 100 µL do líquido RPMI 1640 previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ). Posteriormente, 100 µL da solução de CH3ISACN, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Seguidamente, por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois (2:1), foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL do produto e, no caso do sorbitol, uma concentração final de 0,8 M em cada cavidade. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo RPMI 1640 e sorbitol (0,8) 100 µL de água destilada estéril e 10 µL da suspensão de cada espécie. Além disso, o controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 100 µL do RPMI 1640 em um orifício sem a suspensão dos fungo. As placas serão seladas e incubadas a 35°C por até 48 horas para ser realizada a leitura (FROST *et al.*, 1995; ZACCHINO, 2001).

4.8.2 Ação dos produtos sobre a membrana celular: Ensaio com ergosterol

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, ocasionando danos à membrana celular fúngica (VALGUS, 2003). Caso os efeitos do produtos teste seja sobre a célula fúngica sejam devido à ligação ao ergosterol presente na membrana, pode-se verificar se esses produtos interagem diretamente com o esterol, pois na presença de ergosterol exógeno no meio de cultura ocorrerá prevenção na ligação do produtos

ao ergosterol da membrana. Dessa maneira, as CIMs dos produtos tendem a aumentar na presença do ergosterol exógeno, pois precisará de uma concentração muito maior deles para que possa interagir com ergosterol da membrana fúngica.

A determinação da CIM dos produtos contra cepas fúngicas foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (ALAMAR[®]) e em duplicata semelhante ao protocolo exposto na determinação da CIM. O meio de cultura (RPMI 1640) foi utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich[®]). Para fins de comparação, o mesmo procedimento foi executado com o antifúngico anfotericina B, cujo mecanismo de ação é conhecido e envolve sua ligação ao ergosterol presente na membrana citoplasmática fúngica. As placas foram incubadas a 35±2 por até 48h para realização da leitura. Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo RPMI 1640 e ergosterol nas mesmas concentrações e 10 µL do inóculo de cada espécie. Também será realizado o controle de esterilidade, onde será colocado 100 µL do RPMI 1640 em um orifício sem a suspensão dos fungos (ESCALANTE *et al.*, 2008).

4.9 Ensaio de formação de Biofilme

Para avaliar o efeito da CH3ISACN na inibição da formação de biofilme de cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, foi empregado o teste do cristal violeta (NewProv, Pinhas-PR, Brasil). Em tubos de microdiluição serão misturados 900 µL de caldo RPMI 1640; 100 µL de CH3ISACN (na concentração da CIM) e 100 µL da suspensão das suspensões de *C. albicans* e *C. glabrata*, preparadas como suspensão de cultura recente em NaCl 0,9%, com turbidez padronizada com o tubo de MacFarland nº 5. Os sistemas são incubados à por 48h (CHALTON, 2008).

Após o período de incubação, o caldo são removidos e suas paredes lavadas de 3-5 vezes com água destilada para remover qualquer célula planctônica depositada. Depois de secas, 1 mL de cristal violeta 1% é introduzido nos microtubos e após 20 minutos, o corante é descartado e seu excesso nas paredes é removido com água destilada. Em seguida, foram preenchidos com 1 mL de etanol absoluto e 30 minutos após o repouso, é determinada a absorbância da solução cristal violeta-etanol a $\lambda = 590$ nm (Kasvi, 4NM). O controle do teste foi realizado com as cepas inoculadas em caldo RPMI 1640 e os ensaios foram realizados em triplicata.

O percentual de redução da adesão foi calculado pela relação entre as médias da medida em triplicata, das densidades ópticas do teste e do controle, dividido pela média da densidade óptica obtida no controle, multiplicando por 100 através da fórmula:

$$\frac{ODC - ODT}{ODC} \times 100$$

ODC é a média da densidade óptica do controle (microrganismo + RPMI) e ODT refere-se a média da densidade óptica do produto teste e os padrões. (Gomes *et al.*, 2020). A adesão foi considerada fraca (se <40%), moderada (se entre 40 e 80%) ou forte (se >80%) (CHARLTON, 2008). O grau de inibição do biofilme foi classificado como forte (> 80%), moderado (entre 40,01 e 79,99%) ou fraco (se < 40%) (RODRIGUES *et al.*, 2010).

4.10 Análise estatística

Os dados dos ensaios de CIM, CFM, estudo de associação e mecanismo de ação foram analisados por meio da estatística descritiva e inferencial expressos pela média dos resultados. Para os dados do ensaio de inibição de formação de biofilme foram expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Os resultados do ensaio de avaliação da atividade antifúngica da molécula CH3ISACN frente cepas *C. albicans* e *C. glabrata* estão expressos na tabela 1 juntamente com os resultados frente a atividade dos antifúngicos licenciados fluconazol e anfotericina B utilizados como padrão.

Tabela 1. Média dos resultados da avaliação da CIM (n=3) da CH3ISACN, fluconazol e anfotericina B frente cepas de *Candida* – Técnica de microdiluição.

Microrganismo	Moléculas (µg/mL)			Controles	
	CH3ISACN	Fluconazol	Anfotericina B	<i>Candida</i>	RPMI
<i>C. albicans</i> ATCC-76485	16	32	2	+	-
LM-7	32	64	2	+	-
LM-44	64	64	4	+	-
LM-50	128	128	4	+	-
LM-111	64	64	4	+	-
LM-261	64	128	4	+	-
LM-300	64	64	4	+	-
LM-441	64	64	8	+	-
<i>C. glabrata</i> ATCC-90030	32	64	4	+	-
LM-18	32	64	4	+	-
LM-19	64	128	4	+	-
LM-20	32	64	8	+	-

(+): Crescimento do microrganismo; (-): Não houve crescimento do microrganismo

Fonte: Autoria própria (2023).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) representa um parâmetro essencial na análise de susceptibilidade de um microrganismo a determinadas substâncias, onde o método de diluição em caldo torna-se um dos mais adequados para determinar tal concentração de forma quantitativa e qualitativa, validada pela ausência de crescimento fúngico

no controle de esterilidade e presença de crescimento no controle de crescimento (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

A CH3ISACN na concentração de 64 µg/mL apresentou atividade biológica sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata*, inibindo o crescimento de 11 das 12 (92%) cepas testadas, sendo 7 das 8 (87%) cepas de *C. albicans*. Apenas uma cepa (LM-50) foi inibida em uma maior concentração de 128 µg/mL. *C. glabrata*, na concentração de 64 µg/mL, houve inibição das 4 (100%) cepas testadas, sendo três dessas (*C. glabrata* ATCC-90030, LM-18 e LM-20) inibidas na concentração de 32 µg/mL. Dessa forma, de acordo com os critérios de Sartoratto *et al.*, 2004, a molécula apresentou forte atividade biológica, pois a CIM estabelecida na concentração 64 µg/mL foi menor que 500 µg/mL.

O controle realizado com os antifúngicos padrão apresentou resultados satisfatórios, pois o fluconazol obteve CIM de 64 µg/mL e a anfotericina B de 4 µg/mL. O controle de viabilidade das leveduras foi eficiente, assegurando o crescimento durante a realização dos ensaios fúngicos, bem como a esterilidade do meio, atestada pela ausência crescimento de microrganismos no controle de esterilidade.

Os resultados obtidos no presente estudo condizem com os estudos prévios realizados com moléculas derivadas da isatina. Hassan *et al.*, (2020) avaliou o efeito antifúngico, antibacteriano e antimicobateriano de tiosemicarbazonas à base de isatina. Dentre todas as cepas testadas, a atividade antifúngica dos compostos teste exibiram efeitos mais promissores sobre *C. albicans* com valores de CIM que variou de 30 µg/mL a 60 µg/mL.

Em um recente estudo, conduzido por Shingh *et al.*, (2023) também foi constatado significativa atividade antifúngica de um derivado da isatina contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Dessas cepas, o derivado da isatina foi mais eficaz contra *C. albicans* e *C. glabrata* com valores de CIM de 3,9 µg/mL e 7,8 µg/mL respectivamente.

Quanto aos resultados relacionados ao fluconazol, observou-se que a molécula na concentração de 64 µg/mL foi capaz de inibir o crescimento fúngico de 9 das 12 cepas testadas, representando uma inibição de 75%. Além disso, a molécula inibiu especificadamente 6 (75%) das 8 cepas testadas de *C. albicans* e 2 (50%) das 4 cepas testadas de *C. glabrata*, referindo, portanto, a uma molécula eficaz no crescimento de ambas.

O resultado para fluconazol corrobora com um estudo recente conduzido por Wang *et al.*, (2021) que observou que a CIM para *C. albicans* ficou definida na concentração de 64 µg/mL, bem como o estudo de ARASTEHFAR *et al.*, (2020) também condizem com os

resultados encontrados, pois em seu estudo foi observado que a CIM de *C. glabrata* ocorreu na concentração $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Em comparação com outras espécies da mesma cepa de *Candida*. *C. glabrata* é mais tolerante aos antifúngicos, em especial aos azóis, o que a permite desenvolver resistência antifúngica mais rapidamente, devido a mutação no gene alvo ERG11, bem como devido aos componentes de resistência da própria célula fúngica, tais como a superexpressão das bombas de efluxo (NICLODI, DANIELLI, 2023; ROCHA *et al.*, 2021).

Dentre os controles com antifúngicos usados nos ensaios de atividade antifúngica, a anfotericina B foi a molécula que apresentou melhor atividade sobre ambas as cepas testadas com relação a CIM. Na concentração de $4 \mu\text{g/mL}$ inibiu 87% de *C. albicans* e 75% de *C. glabrata*. Estudos anteriores indicam que os isolados de *Candida* de várias espécies são sensíveis à anfotericina e devido à isso, desde a sua descoberta, é utilizada como tratamento de escolha para infecções fúngicas graves, uma vez que apresenta baixa taxa de resistência microbiana e amplo espectro de ação (CAVASSIN *et al.*, 2021).

As ITU, especialmente quando se tornam infecções sistêmicas, carecem de alto grau de tratamento. As alternativas terapêuticas atualmente disponíveis são escassas e alguns apresentam grande toxicidade, o que pode limitar seu uso devido a apresentação de efeitos adversos graves (SUBERVIOLA, 2021).

Uma vez que há necessidade de encontrar moléculas mais eficazes e seguras no tratamento de infecções, o uso de produtos biossintéticos estão obtendo maior atenção em especial ao potencial antifúngico, pois através da tecnologia farmacêutica é possível sintetizar e melhorar moléculas bioativas já existentes (KANG *et al.*, 2019).

A CFM é um ensaio que complementa à CIM, uma vez que a substância antifúngica pode obter efeito fungicida ou fungistático de acordo com a sua concentração e o tempo de exposição ao microrganismo. Uma forma de verificar se o produto teste é fungicida ou fungistático se dá através do cálculo da razão dos valores obtidos da CFM e CIM, em que valores maiores que 4 apresentam efeito fungistático ($\text{CFM/CIM} > 4$) e valores menores ou igual a 4 apresentam atividade fungicida ($\text{CFM/CIM} \leq 4$) (Tabela 2) (SIDDIQUI *et al.* 2013).

Tabela 2. Média dos resultados da avaliação de CFM (n=3) da CH3ISACN frente às espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*.

Microrganismo	CH3ISACN		
	CFM	CFM/CIM	Atividade
<i>C. Albicans</i> ATCC-76485	128	8	Fungistático
LM-7	128	4	Fungicida
LM-44	128	2	Fungicida
LM-50	128	1	Fungicida
LM-111	256	4	Fungicida
LM-261	128	2	Fungicida
LM-300	128	2	Fungicida
LM-441	256	4	Fungicida
<i>C. Glabrata</i> ATCC-90030	128	4	Fungicida
LM-18	128	4	Fungicida
LM-19	128	2	Fungicida
LM-20	128	4	Fungicida

Fonte: Autoria própria (2023)

Conforme observado na tabela 2, a CFM da CH3ISACN ficou estabelecida na concentração de 128 µg/mL, inibindo o crescimento fúngico de 10 (85%) das 12 cepas testadas, sendo especificadamente 75% (6 de 8 cepas) de *C. albicans* e 100% das cepas de *C. glabrata*. Apenas as cepas LM-111 e LM-441 de *C. albicans* obtiveram um valor mais alto de CFM na concentração de 256 µg/mL. Dessa forma, foi calculada a razão CFM/CIM para determinar se o produto sintético possui atividade fungistático ou fungicida conforme proposto por Siddique *et al.*, (2013).

É possível observar que a CH3ISACN apresentou notável atividade fungicida para todas as cepas testadas, com exceção da *C. albicans* ATCC-76485 que apresentou efeito fungistático. Tal fato pode ser justificado uma vez que o produto teste pode ser afetado por variações genéticas e/ou fenotípicas nas cepas de *C. albicans* e que o seu uso para essa cepa deve ser avaliado com cautela. Esses achados são corroborados com os de Dar *et al.*, (2019) que relataram que os resultados da CFM demonstraram que todos os derivados da isatina testados apresentaram potencial de matar as cepas de *C. albicans*.

O conhecimento se o agente é fungicida ou fungistático é de grande importância, uma vez que o fármaco fungicida se torna mais significativo principalmente no caso de pacientes imunocomprometidos, pois o organismo pode ser insusceptível de combater a infecção. Além disso, microrganismos que são apenas impedidos de se desenvolverem são mais propícios ao desenvolvimento de resistência, prejudicando, dessa forma, o tratamento. Ainda, salienta-se que as células fúngicas são mortas quando a molécula possui efeito fungicida e não demonstram o risco para desenvolvimento de resistência (MAGALHÃES, QUEIROZ-FERNADES, 2021; PAI, GANAVALLI, KIKKERI, 2018).

Portanto, a CH3ISACN pode ser considerada como uma substância sintética com grande potencial para ser utilizada como fonte de novos antimicrobianos ou como forte candidata a fármaco devido sua boa atividade anti-*Candida*.

5.2 Ensaio de associação pelo método *checkerboard*

Com o surgimento de resistência aos azóis pelo gênero de *Candida*, em especial quando se trata de espécies que possuem resistência intrínseca, faz com que nessas circunstâncias seja recomendada a terapia combinada entre substâncias, as colocando como um tratamento de primeira linha nesses casos (REIS, SANTOS, ALVES, 2022).

A combinação de fármacos antifúngicos é uma estratégia que pode ser benéfica quando as interações medicamentosas são sinérgicas, principalmente quando se trata dos casos de infecção por organismo resistente. Por essa razão, quando o tratamento convencional não supre as expectativas do resultado esperado, a interação com antifúngicos é um dos principais agravantes que levam aos pesquisadores procurarem essas combinações na busca de eficácia terapêutica (RAFFETIN *et al.*, 2018).

O estudo voltado para a associação entre o produto teste com fluconazol e anfotericina B realizado com o ensaio padrão de microdiluição em *checkerboard*, demonstrou diferença significativa entre os resultados encontrados quando combinados (substâncias A e B), em relação a CIM de cada substância agindo de maneira individual contra as cepas de *Candida* podendo ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre a CH3ISACN e anfotericina B, bem como CH3ISACN e fluconazol sobre as cepas *C. albicans* e *C. glabrata*.

Cepas	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de Interação
	CH3ISACN	Fluconazol		
<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
<i>C. albicans</i> (LM-7)	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
<i>C. glabrata</i> (ATCC-90030)	1	0,125	1,125	Indiferente
<i>C. glabrata</i> (LM-18)	1	0,125	1,125	Indiferente

Cepas	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de Interação
	CH3ISACN	Anfotericina B		
<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
<i>C. albicans</i> (LM-7)	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
<i>C. glabrata</i> (ATCC-90030)	1	0,125	1,125	Indiferente
<i>C. glabrata</i> (LM-18)	1	0,125	1,125	Indiferente

CIF – Concentração Inibitória Fracionária; ICIF – Índice da Concentração Inibitória Fracionária.

Fonte: Autoria própria (2023).

Com base nos resultados expostos, observa-se que a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) da CH3ISACN, fluconazol e anfotericina B totalizou 0,125 para *C. albicans* e apenas a molécula teste apresentou valor de 1 para *C. glabrata*. A partir da análise dos valores obtidos de ICIF foi detectado que o perfil de interação para *C. albicans*, de ambas as cepas testadas, foi do tipo sinergismo e para *C. glabrata* foi do tipo indiferente.

A combinação de fármacos trata-se de uma estratégia para combater infecções fúngicas, em especial de microrganismos que apresentam grau de resistência através do aumento da eficácia dos medicamentos já utilizados. Além disso, a terapia combinada contribui para diminuição de dosagem de medicamentos que frequentemente apresentam efeitos adversos que dificultam o tratamento (BAYM, STONE, KISHONY, 2016).

O sinergismo acontece quando a associação de dois ou mais fármacos intensifica ou potencializa o efeito do outro, dessa forma, o efeito final será maior que a soma dos efeitos isolados. Com isso, esse efeito contribui para o aumento na capacidade efetiva da droga em gerar uma resposta promissora, redução de dose e em consequência queda de toxicidade.

Ademais, o efeito indiferente ocorre quando o mecanismo de um fármaco não interfere no mecanismo de ação do outro. Enquanto que o efeito aditivo representa a soma dos efeitos isolados por uma mesma via biológica, mas que atuam de formas diferentes. Vale ressaltar que a CH3ISACN não apresentou antagonismo, que ocorre quando a resposta farmacológica de um medicamento é diminuída ou suprimida pelo outro (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Dessa forma, levando em consideração que espera-se o aumento do efeito para tratar infecções fúngicas, tal efeito seria indesejável.

Dar *et al.*, (2019) conduziu experimentos para avaliar o perfil antifúngico de derivados de isatina contra cepas de *C. albicans*. No ensaio de associação os derivados da isatina apresentou variados tipos de interação, demonstrando que a maioria das combinações foram sinérgicas (54%) ou aditivas (32%) e nenhuma apresentou antagonismo. Essas observações condizem com os resultados encontrados no presente trabalho, pois a CH3ISACN apresentou comportamento semelhante.

5.3 Mecanismo de ação da CH3ISACN

As substâncias biologicamente ativas atuam através de mecanismo de ação. Nesse sentido, moléculas antifúngicas têm como principal alvo para ação de fármacos a parede celular e a membrana plasmática. Os fármacos antifúngicos podem atuar por meio da inibição da biossíntese do ergosterol, por complexação com o ergosterol presente na membrana plasmática ou por meio da inibição de enzimas essenciais para manutenção da parede fúngica (AHMAD *et al.*, 2011). Nessa perspectiva, foi investigada a provável ação da CH3ISACN sobre essas duas estruturas visando elucidar seu mecanismo de ação através dos ensaios com sorbitol e ergosterol.

A parede celular fúngica é constituída basicamente de polissacarídeos e proteínas como os β -glucanos e quitinas. Dentre todas as estruturas celulares fúngicas a parede celular é considerada a mais importante devido sua importante função de proteção, formato e a comunicação intracelular. Por essa razão, tornou-se um significativo alvo para ação de antifúngicos uma vez que qualquer dano nessa estrutura pode ser vital para os fungos (MENEZES *et al.*, 2022).

Na tabela 4 estão registradas os resultados da atividade da substância teste quando em contato com as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* na presença e ausência de sorbitol para todas as cepas. A partir da análise dos dados, verifica-se que a CIM do composto testado aumentou com a adição do sorbitol a 0,8 M para todas as cepas quando comparado com o controle

(ausência de sorbitol). Em resultados mais discriminados, a CIM da molécula teste para *C. albicans* ATCC-76485 e LM-7, *C. glabrata* (ATCC-90030 e *C. glabrata* LM-18 na ausência de sorbitol foram, respectivamente, no valor de 16 µg/mL e 32 µg/mL para as três últimas, já na presença de sorbitol esses valores se elevaram para 512 µg/mL para tais cepas. Quando avaliada com a *C. glabrata* ATCC-90030 a CIM dessa passou de 32 µg/mL para 1024 µg/mL na presença do sorbitol.

Desse modo, levando em consideração o aumento pronunciado da CIM na presença do sorbitol, pode-se sugerir que a CH3ISACN apresenta atividade antifúngica por meio da sua ação sobre a parede celular fúngica. As drogas que atuam inibindo a síntese da parede celular fúngica tem seu efeito antifúngico revertido num meio contendo um estabilizador osmótico que estabiliza os protoplastos fúngicos, que nesse caso foi utilizado o sorbitol a 0,8 M. Com isso, o produto atua na parede celular ocasionando a lise das células fúngicas na ausência de um estabilizador osmótico, mas permite seu crescimento na presença desse (TURECKA, 2018; PRISTOV, GHANNOUM, 2019).

Este é o primeiro estudo que demonstra tal mecanismo, portanto, não há nenhuma pesquisa sobre o efeito da CH3ISACN sobre a parede celular de leveduras do gênero *Candida* com testes de sorbitol e ergosterol.

Tabela 4. Efeito da CH3ISACN sobre as cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* na ausência e presença de sorbitol.

Microrganismo	CH3ISACN	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	16	512
<i>C. albicans</i> (LM-7)	32	512
<i>C. glabrata</i> (ATCC-90030)	32	>1024
<i>C. glabrata</i> (LM-18)	32	512

Fonte: Autoria própria (2023)

Assim como o colesterol nas células dos mamíferos, o ergosterol é um componente esterol importante encontrado na membrana citoplasmática fúngica, que exerce um papel vital na sua estrutura e funções. Quando há danos nessa estrutura podem acontecer desequilíbrios osmóticos que resultam na lise celular (MENEZES *et al.*, 2022).

Esse ensaio avalia a ação do produto testado na membrana plasmática fúngica e é interpretado através da alteração dos valores da sua CIM na ausência e presença do ergosterol

exógeno. Caso o produto atue de alguma forma no ergosterol, ocorre ligação ao ergosterol exógeno que está presente no meio de cultura e rapidamente forma um complexo entre a substância e o ergosterol exógeno e consequentemente, haverá redução do dano a membrana celular fúngica, necessitando portando de concentrações maiores de ergosterol para que provoque efeito sobre a membrana celular. Consequentemente, observamos esse efeito com o aumento da concentração da sua CIM (ESCALANTE *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2017).

Na Tabela 5 estão expressos os resultados do mecanismo de ação da CH3ISACN na presença e ausência de ergosterol. O ergosterol está presente nas membranas celulares dos fungos, que apresenta dentre suas principais funções o mantimento da estrutura celular (RODRIGUES, 2018).

Tabela 5. Efeito da CH3ISACN sobre as cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* na ausência e presença de ergosterol.

Microrganismo	CH3ISACN		Anfotericina B	
	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	16	16	2	8
<i>C. albicans</i> (LM-7)	32	32	2	8
<i>C. glabrata</i> (ATCC-90030)	32	32	4	64
<i>C. glabrata</i> (LM-18)	32	32	4	64

Fonte: Autoria própria (2023)

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, é possível observar que a CIM da molécula testada permaneceu inalterada para ambas as cepas tanto na ausência como na presença do ergosterol exógeno, sugerindo que esse derivado da isatina não atua por ligação (complexação) com o ergosterol da membrana.

Nesse ensaio, foi realizado um controle com a anfotericina B, na qual possui mecanismo de ação conhecido por atuar no ergosterol fúngico. Foi possível observar que houve aumento da sua CIM na presença de ergosterol exógeno, em comparação ao controle (CIM na ausência de ergosterol). Esse resultado era esperado, haja vista que sua ação já é elucidada e envolve sua ligação direta ao ergosterol, com a formação de poros que ocasiona um desequilíbrio osmótico. Esse desregulação osmótica acarreta no extravasamento de componentes intracelulares e em consequência causa a lise celular (LIMA *et al.*, 2018).

5.4 Ensaio Biofilme

A atividade das substâncias sobre a formação do biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* foi atestada pela redução da adesão das células na superfície dos microtubos. Os valores obtidos das densidades ópticas no teste do cristal violeta, do tratamento e no controle estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Percentual de redução e classificação de adesões celulares *in vitro* no ensaio de formação de biofilme.

Droga	<i>C. albicans</i> LM-7		<i>C. albicans</i> ATCC-76485	
	% inibição	tipo de adesão	% inibição	tipo de adesão
CH3ISACN	34,9 ± 9,6	alta	57,1 ± 16,5	moderada
Anfotericina B	46,0 ± 5,58	moderada	72,0 ± 2,3	moderada
Fluconazol	57,0 ± 9,26	moderada	63,3 ± 7,6	moderada
Droga	<i>C. glabrata</i> LM-18		<i>C. glabrata</i> ATCC-90030	
	% inibição	tipo de adesão	% inibição	tipo de adesão
CH3ISACN	0,0 ± 5,6	alta	0,0 ± 27,6	alta
Anfotericina B	0,0 ± 6,2	alta	21,4 ± 1,48	alta
Fluconazol	0,0 ± 17,8	alta	32,5 ± 0,3	alta

*Dados foram obtidos de um experimento realizado em triplicata e apresentados em valores de porcentagem de redução da adesão do biofilme, obtidos a partir da média ± e.p.m. em comparação com o controle negativo.

Fonte: Autoria própria (2023)

Verificou-se que o produto CH3ISACN não obteve inibição satisfatória do biofilme das cepas estudadas considerando os percentuais da redução da adesão celular, que variou de 34% para *C. albicans* LM-7 e 57% para *C. albicans* ATCC-76485, com uma adesão celular alta e moderada. No entanto, não houve redução para *C. glabrata*, caracterizando ausência de inibição do biofilme formado, visto que as células estavam altamente aderidas ao substrato.

Em comparação aos controles utilizados, verifica-se que a anfotericina B e fluconazol apresentaram melhor percentual de redução de biofilme quando testada na cepa *C. albicans* ATCC-76485, com respectivamente 72 e 63% de redução da adesão celular, caracterizando uma adesão celular moderada.

No recente estudo realizado por Singh *et al.*, (2023) realizado com híbridos isatina-benzotriazol ligados ao triazol, verificou-se que o produto reduziu significativamente o biofilme

de *C. albicans* formado através de dose dependente. No tratamento com 1/2 x CIM, 1 x CIM e 2 x CIM reduziu respectivamente, cerca de 74, 88 e 94%. No entanto, vale ressaltar que a hibridação de moléculas consistem em unir características estruturais ou grupos farmacofóricos de dois ou mais fármacos ativos para obter uma molécula com propriedades farmacológicas com potência, eficácia e afinidades aumentadas (WERMUTH, 2008; SANTOS, TEIXEIRA, CARNEIRO, 2020). Nesse caso em questão foram utilizados os triazóis, tais como o fluconazol, voriconazol, rovuconazol que são amplamente prescritos para tratar infecções por *Candida* (LESSA, 2021). Portanto, a junção com azólicos potencializou o efeito anti-biofilme da isatina do estudo em questão.

Estudos demonstram que tanto o fluconazol quanto a anfotericina B apresentam resistência aos biofilmes de *C. albicans*. Turan e Demirbilek (2018) verificaram que o fluconazol e anfotericina B inibiram, respectivamente cerca de 21 e 31% da formação do biofilme de *C. albicans*. Além disso, no estudo de Malchikova e Klyasova (2021) para todas as inibições de biofilme de *Candida* testadas, dentre elas a *C. albicans*, a CIM do fluconazol foi superior a 1024 mg/mL e anfotericina B foi maior que 4 mg/mL, o que demonstra a sua resistência à tais fármacos, corroborando com o atual estudo.

A formação de biofilmes por várias espécies de *Candida* tem sido bem documentada em variados contextos. Contudo, *C. albicans* é a espécie mais discutida no ambiente científico. Dessa forma, o conhecimento a respeito da formação de biofilme advém do estudo dessa cepa. Essa formação envolve a adesão celular de leveduras em uma superfície, que posteriormente ocorre a formação de microlônias de células que surgem através de uma rede de hifas e a produção da matriz extracelular. No entanto, estudos de imagens de biofilme de *C. glabrata* revelam rede espessa de células de leveduras em uma matriz extracelular sem o componente de hifa que é presente nos biofilmes daquela, isso uma vez que *C. glabra* é um organismo haplóide e não é capaz de formar micélios (D' ENFERT, JANBON, 2016). Embora tal fato não seja surpreendente, levantam-se questionamentos acerca das peculiaridades de formação de biofilme em ambas as espécies, pois a diferenciação em hifas desempenha um papel estrutural importante na formação de biofilme (MOYES *et al.*, 2016)

Ainda, *C. glabrata* possui mecanismos de resposta ao estresse, como por exemplo, apresenta-se altamente tolerante ao estresse oxidativo da parede celular regulada por uma catalase CgCta1, duas superóxido dismutases CgSod1 e CgSod2 e enzimas glutathione biossintética CgGsh1 e CgGsh2. A via de sinalização mediada pela proteína quinase C (PKC) é responsável por proteger a parede celular e sua proteína quinase ativada por mitógeno terminal

(MAPK) juntamente com outros componentes da cascata, são necessários para sobrevivência parede celular ocasionado por estresse (HEALEY, PERLIN, 2018).

De todas as cepas de *Candida*, *C. glabrata* é a menos susceptível aos agentes antifúngicos. Um dos principais fatores que contribuem para sua resistência é a sua ampla diversidade genética. Além dos fatores de neutralização do estresse antifúngico como ativação de bombas de efluxo de múltiplas drogas, superexpressão da enzima alvo dos esteróis e mutação nos genes *FK1* e *FSK2*, a presença de mutação *PDR1* parece aumentar sua capacidade de se adaptar a condições estressores, bem como aumenta a expressão do gene epitelial de adesina (*EPA1*). Nesse contexto, o genoma dessa cepa possui grande quantidade de genes EPA (adesina epitelial), que codificam as proteínas adesinas, responsáveis para formação do biofilme e consequentemente pelo aumento de tolerância aos fármacos (WHALEY, ROGERS, 2016; KUMAR *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que alelos *MSH2* diversificam as populações da cepa para sobreviver após exposições prolongadas aos antifúngicos, bem como genes *PMS1* e *MSH6*. No entanto, como os o controle desse genes afetam a *C. glabrata* ainda é desconhecido (DELLIERE *et al.*, 2016; HEALEY, PERLIN, 2018). Diante do exposto, a capacidade de uma célula tolerante como *C. Glabrata* escapar dos fármacos antifúngicos sugere que ocorra em função do seu alto potencial mutagênico, no entanto, em decorrência dos estudos sobre a resistência em biofilmes dessa cepa serem limitados, necessita-se, dessa forma, de maiores estudos para elucidar o mecanismo de tolerância aos antifúngicos.

6 CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode-se concluir que a CH3ISACN:

- Apresenta atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, apresentando atividade fungicida nas concentrações avaliadas;
- O produto demonstrou sinergismo quando associado com o fluconazol e a anfotericina B frente *C. albicans* e indiferença para *C. glabrata*;
- O mecanismo de ação antifúngica da molécula sintética avaliada sobre *C. albicans* e *C. glabrata* envolve sua ação sobre a parede celular fúngica;
- Neste estudo, a atividade anti-biofilme da molécula teste não foi constatada frentes as cepas testadas.

Tais resultados demonstram que a CH3ISACN possui potencial atividade antifúngica e deve ser submetida a novos estudos para aprofundamento e detalhamento dos seus efeitos, podendo se tornar uma candidata à fármaco para implementação do arsenal dos fármacos antifúngicos.

REFERÊNCIAS

ALFOUZAN, W. A.; DHAR, R. Candiduria: evidence-based approach to management, are we there yet?. **Journal de Mycologie Médicale**, v.27, n. 3, p. 293-302, 2017.

ANDRADE, S. D.; ANDRADE, I. S. G.; CASTRO, A.; MONTENEGRO, Y. M. R.; MOREIRA, D. N, MAIA, R. A.; MARTINS, F. T.; VAZ, B. G.; SANTOS, G. F.; LIMA, E. O.; FARIAS, B. K. S.; JUNIOR, C. G. L. Deep eutectic solvent co-catalyzed synthesis and antimicrobial activity of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives. **Journal of Molecular Structure**. v. 1273, 2023.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 445-451, 2017.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 6, p-71-79, 2016.

BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, 2016.

BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R. Urinary tract infections and *Candida albicans*. **Central European Journal of Urology**. v. 68, n. 1, p. 96–101, 2015.

BERTO, C.; WIRTH, F.; BARTH, N.; HERMES, D. M. Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada. **Revista Uningá**. v. 55, n. 3, p. 52-71, 2018.

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

BUTASSI, E.; SVETAZ, L.; CARPINELLA, M. C.; EFFERTH, T.; ZACCHINO, s. Fungal biofilms as a valuable target for the discovery of natural products that cope with the resistance of medically important fungi—latest findings. **Antibiotics**, v. 10, n.9, 2021.

CAVASSIN, F. B.; BAÚ-CARNEIRO, J. L.; VILAS-BOAS R. R.; QUEIROZ-TELLES, F. Sixty years of Amphotericin b: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infectious Diseases and Therapy**. v.10, n.1, p. 115–47, 2021.

CHALTON, T.S. A repeatable biofilm removal assay and its application in the assessment of commercial cleaning formulations for medical devices. **Healthcare Infection**. v. 13, p. 131–135, 2008.

CINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard, M31 A3, Wayne, PA.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: LORRIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 739-788 p. 1991.

COLOMBO, A.; L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T.; PASQUALOTTO, A. C.; ANDREOTTI, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; NOUÉR, S. A.; NUCCI, M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: na analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**. V.40, n.10, p. 1498-1498, 2014.

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

D' ENFERT, C.; JANBON, G. Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches?. **FEMS Yeast Research**. v. 16, n. 1, 2016.

DANTAS, L. L. S. F. R.; FONSECA, A. G.; PEREIRA, J. R.; FURTADO, A. A.; GOMES, P. A. T.M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; LEITE, A. C. L.; RÊGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; LEMOS, T. M. A. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the isatin derivative (Z)-2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-ylidene)-N-phenyl-hydrazinecarbothioamide in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, 2020.

DAR, O. A.; LONE, S. A.; MALIK, M. AQLAN.; A, F. M.; WANI, M. Y.; HASHMI, A. A.; AHMAD, A. Synthesis and synergistic studies of isatin based mixed ligand complexes as potential antifungal therapeutic agents. **Heliyon**. v, 5, n. 7, 2019.

DELLIERE, S.; HEALEY, K.; GITS-MUSELLI, M.; CARRARA, B.; BARBARO, A.; GUIGUE, N.; LECEFEL, C.; TOURATIER, S.; DESNOS-OLLIVIER, M.; PERLIN, D.S.; BRETAGNE, S.; ALANIO, A. Fluconazole and echinocandin resistance of *Candida glabrata* correlates better with antifungal drug exposure rather than with MSH2 mutator genotype in a french cohort of patients harboring low rates of resistance. **Frontiers Microbiology**. v. 7, p. 2038, 2016.

DEMIRCI-DUARTE, S.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; GÜLMEZ, D. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis* complex isolates: increase in fluconazole resistance in 21 years. **Mycoses**, v. 64, n. 8, p. 823–830, 2021.

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

EGGADI, V.; KULANDAIVELU, U.; SHESHAGIRI, S. B. B.; JUPALLI, V. R. Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer activity of Thiazole Tagged Isatin Hydrazones. **Journal of pharmaceutical chemistry**. v. 3, n.3, 2016.

EKINCI, F.; YILDIZDAS, D.; HOROZ, O. O.; GUNDESLIOGLU, O. O.; ALABAZ, D. Treatment of *Candida* urinary tract infections with micafungin in children. **Pediatrics Internacional**. v. 6, 2021.

EKŞİ, F.; ALI HASSAN, B.; KAYA UĞUR, B.; YILDIZ, H.; ERINMEZ, M.; GANIDAĞLI, S. Uma análise epidemiológica das infecções urinárias por *Candida* spp. Em unidade de terapia intensiva. **Revista de Epidemiologia e Controle De Infecção**. v. 12, n.2, p. 1-7, 2022.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, n. 10, p. 1720-1725, 2008.

FERNANDES, B. F; GONÇALVES, H. R.; GUIMARÃES, M. R.; ALVES, A. A.; BIESKI, I. G. C. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v.5, n. 9, 2019.

FLORES-MIRELES, A.; HREHA, T. N.; HUNSTAD, D. A. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. **Spinal Cord Injury Rehabilitation**, v. 25, n. 3, p. 228-240, 2019.

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.

FUCHS, F. D.; WANNAMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 4. Ed, cap.40, p. 575-577, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

FURTADO, H. L. A.; MOTTA, B. L. A.; MENDES, T, O, S.; SANTOS, J. R. A. Fatores predisponentes na prevalência da candidíase vulvovaginal. **Revista de Investigação Biomédica**. V. 10, n. 2, p. 190-97, 2018.

GAJDÁCS, M.; DÓCZI, I.; ÁBRÓK, M.; LÁZÁR, A.; BURIÁN, K. Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: results from a 10-year retrospective survey. **Central European Journal of Urology**, v.72, n.2, p. 209-214, 2019.

GHARAGHANI, M. TAGHIPOUR, S. HALVAEEZADEH, M. MAHMOUDABADI, A Z. Candiduria; a review article with specific data from Iran. **Turkish journal of urology**. v. 44, n.6, p. 445-452, 2018.

GINA, M.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; BONIFÁCIO, B. V.; RIBOT, J. L. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1-6, 2019.

GOMES, V. T.; PADILHA, I. Q. M.; AMARAL, I. A. P. G.; VASCONCELOS, U. Assessment of high-power LED in the adhesion of wild *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 11, p. 75-82, 2020.

GOVINDARAJAN, A. BISTAS, K. G, INGOLD, C. J, ABOEED, A. Fluconazole. **Stat Perals**. 2022.

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

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

HASSAN, M.; GHAFARI, R.; SARDARI, S.; FARAHANI, Y. F.; MOHEBBI, S. Discovery of novel isatin-based thiosemicarbazones: synthesis, antibacterial, antifungal, and antimycobacterial screening. **Reserach in Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n.3, p. 281-290, 2020.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S. Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, 2018.

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

HOOG, G. S.; GUARRO, J. Atlas of clinical fungi. Central bureau voor schimmelcultures, 1995.

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.

JACOBS, D. M.; DILWORTH, T. J.; BEYDA, N. D.; CASAPAO, A. M. Overtreatment of asymptomatic candiduria among hospitalized patients: A multi-institutional study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62, n. 1, 2018.

JEAN, SHIO-SHIN, YANG, HUNG-JEN, HSIEH, PO-CHUEN, HUANG, YU-TSUNG, KO, WEN-CHIEN, HSUEH, PO-REN. In vitro susceptibilities of worldwide isolates of intrapulmonary aspergillus species and important candida species in sterile body sites against important antifungals: data from the antimicrobial testing leadership and surveillance program, 2017–2020. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n.6, 2022.

JENKS, J. D., HOENIGL, M. Tratamento da aspergilose. **Journal of Fungi**, v.4, n. 3, p. 98, 2018.

KANG, G. Q.; DUAN, W. G.; LIN, G. S.; YU, Y. P.; WANG, X. Y.; LU, S. Z. Synthesis of Bioactive Compounds from 3-Carene (II): Synthesis, Antifungal Activity and 3D-QSAR Study of (Z)- and (E)-3-Carene-5-One Oxime Sulfonates. **Molecules**. v. 24, n.3, 2019.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Pharmacology Examination & Board Review**. 10ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, p. 420, 2012.

KHATOON, S.; AROOSH, A.; ISLAM, A.; KALSOOM, S.; AHMAD, F.; HAMEED, S.; ABBASI, S. W.; YASINZAI, M.; NASSER, M. M. Novel coumarin-isatin hybrids as potent antileishmanial agents: Synthesis, in silico and in vitro evaluations. **Bioorganic Chemistry**. v. 110, 2021.

KUMAR, K.; ASKARI, F.; SAHU, M. S.; KAUR, R. Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 1-22, 2019.

LESLIE, S. W.; LI, R. Cystitis. **Stat Pearls**, 2022.

LESSA, R. C. S. Núcleos 1,2,3-triazólicos como uma versátil ferramenta para a obtenção de novos compostos bioativos: uma visão geral, **Revista Virtual de Química**, v. 13, n.1, 2021.

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

MAGALHÃES, J. C. S.; QUEIROZ-FERNADES, G. M. Perfil de resistência de agentes de micoses oportunistas no Brasil. **Interamerican Journal of Medicine and Health**. v. 4, 2021.

MALCHIKOVA, A.; KLYASOVA, G. In vitro activity of anidulafungin, caspofungin, fluconazole and amphotericin B against biofilms and planktonic forms of *Candida* species isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 3, 2021.

MENOTTI, A. F. S.; FERRAZ, C. P.; MORAES, L. T.; JARDIM, N. A.; BARROS, Y. V.; GOMES, R. M. V.; ELIAS, R. M.; CORRÊIA, T. F. B. Prevalência de microrganismos em infecções de trato urinário na unidade de terapia intensiva adulto em um hospital de médio porte. **Caderno de Publicações Univag**, n. 10, 2019.

MENEZES, C. P. et al. Investigation on mechanism of antifungal activity of citral against *Cladosporium sphaerospermum* Penz. **Anales de Biología**, v. 43, p. 43-53, 2022.

MOYES, D. L.; WILSON, D.; RICHARDSON, J. P.; MOGAVERO, S.; TANG, S. X.; WERNECKE, J.; HOFES, S.; GRATACAP, R. L.; ROBBINS, J.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; BLAGOJEVIC, M.; THAVARAJ, S.; FORSTERS, T. M.; HEBECKER, B.; KASPER, L.; VIZCAY, G.; LANCU, S. I.; KICHIK, N. HADER, A.; KURZAI, O.; LUO, T.; KRUGER, T.; KNIEMEYER, O.; COTA, E.; BADER, O.; WHEELER, R. T.; GUTSMANN, T.; HUBE, B.; NAGLIK, J. R. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, 532, n. 7597, p. 64-68, 2016.

MORSCHHAUSER, J.; BARKER, K. S.; LIU, T. TERESA, BLAB-WARMUTH, JULIA.; HOMAYOUNI, R.; ROGERS, P. D. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. **Plos Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 1603–1616, 2007.

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

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, p. 1797-1806, 2008.

NICOLODI, M. A.; DANIELLI, G. Um panorama sobre os mecanismos de resistência da *Candida albicans* e o tratamento da candidíase recorrente. **Revista Científica Multidisciplinar**, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2023.

NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96–108, 2017.

ODABASI, Z.; MERT, A. Candida urinary tract infections in adults. **World journal of urology**, v. 38, p. 2699-2707, 2020.

OLIVEIRA, L. L. P.; OLIVEIRA, W. G. P.; ARAÚJO, V. B.; SOBREIRA, I. R. M.; SILVERIO, A. P. Infecções do trato urinário: uma abordagem clínico-terapêutica. **JNT-Facit Business Techonology Jornal**, v. 1, p.392-408, 2021.

OMMEN, P.; ZOBEL, N.; MEYER, R. Quantification of biofilm biomass by staining: Nontoxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of microbiological methods**. v. 141, p. 87-89, 2017.

PAGANO, P.J.; BUCHANAN, L.V.; DAILEY, C.F.; HAAS, J.V.; ENK, R.A. V.; GIBSON, J.K. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**. v. 23, n. 3, p. 226-234, 2004.

PAI, V.; GANAVALLI, A.; KIKKERI, N.N. Antifungal resistance in dermatology. **Jornal Indiano de Dermatologia**, v. 63, n. 5, p. 361, 2018.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHENER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 4, 2018.

PEIXOTO, L. R.; ROSALEN, P. L.; FERREIRA, G. L. S.; FREIRES, I. A.; CARVALHO, F. G.; CASTELLANO, L. R.; CASTRO, R. S. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179–185, 2017.

PEMÁN, J.; RUIZ-GAITÁN, ALBA. Candidemia from urinary tract source: the challenge of candiduria. **Hospital Practice**, v. 46, n. 5. p. 243-245, 2018.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. **Oxford**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

RAFFETIN, A.; COURBIN, V.; JULLIEN, V.; DANNAOUI, E. In Vitro Combination of Isavuconazole with Echinocandins against Azole-Susceptible and-Resistant *Aspergillus* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01382-17, 2018.

RANG, P. H.; DALE, M. M. **Rang & Dale: farmacologia**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REIS, K. W. S.; SANTOS, R. T. S.; ALVES, L. L. Perspectiva da enfermagem sobre as infecções nosocomiais por *Candida* na UTI. **Scire salutis**. v. 12, n. 2, p. 37-47, 2022.

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

RIBEIRO, E. A.; SILVA, R. A.; RAMALHO, T. T.; CASTOR, V. S. Complicações na gestação causadas pela infecção do trato urinário (ITU) – Revisão integrativa. **Revista educação em saúde**, v. 8, n.2 p.149-159, 2020.

RIBERIO, F. C.; ROSSONI, R. D.; BARROS, P. P.; SANTOS, J. D.; FUGISAKI, L. R. O, LEÃO, M. P. V.; JUNQUEIRA, J. C. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. **Journal of Applied Microbiology**. p. 175-185, 2020.

ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L. R.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. *Candida* genus - Virulence factors, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 4, 2021.

ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 4, 2021.

RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A.P.; GOETZ, F.; NASCIMENTO, V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian journal of microbiology**. v. 41, p. 1082-1085, 2010

RODRIGUES, M. L. The multifunctional fungal ergosterol. **American Society of Microbiology**, v. 9, n.5, 2018.

ROSSI, E.; PARONI, M.; LANDINI, P. Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. **Journal of applied Microbiology**. v. 125, n. 6, p. 1587-1602, 2018.

REICHERT-LIMA, F.; LYRA, L.; PONTES, L.; MORETTI, M. L.; PHAM, C. D.; LOCKHART, S. R.; SCHREIBER, A. Z. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 360-365, 2018.

RUIZ-BACA, E.; ARREDONDO-SÁNCHEZ R. I.; CORRAL-PÉREZ, K.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, A.; MENESES-MORALES, I.; AYALA-GARCÍA, V. M.; MARTÍNEZ-ROCHA, L. Molecular mechanisms of resistance to antifungals in *Candida albicans*. **Advances in Candida albicans**, p. 39, 2021.

SALEEM, M.; AHMAD, M.; MEHMOOD, R. F.; SHAHEEN, A.; QAISER, S.; NIAZ, S. I.; ALI, M.; IRSHAD, M.; MEHMOOD, S.; ABUBSHAIT, S. A.; ABUBSHAIT, H. A.; IMRAN, M.; RAUF, A.; ALI, O. M, EL-BAHY, Z. M. Synthesis of isatin and its derivatives having antibacterial, antifungal and cytotoxic activities. **Current organic synthesis**, 2022.

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

SANTOS, L. T. D.; TEIXEIRA, M. L.; CARNEIRO, J. Síntese de candidato à fármaco por hibridação molecular. **Anais do EVENCI – UniBrasil**, v. 5, n.1, 2020.

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

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAF, T. 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.

SIDRIM, J.J. C., ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 2004.

SILVA, C. D. G.; SACNHES, C. G. S.; BAUKEN, F. C. *Candida parapsilosis*: resistência aos antifúngicos. **Revista de saúde e biologia**. v. 17, 2022.

SILVA, K. G. V.; PIRES, K. G. R.; FURTADO, H. L. A., MOTTA, B. L. A.; FIRMO, W. C. A. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Patanal editora**. p. 42-58, 2021.

SILVA, L. R.; DOMINGOS, P. B.; NASCIMENTO, T. C.; MACEDO, L. F.; SILVA, R. T. Infecção do trato urinário em pacientes idosos em atendimento domiciliar: prevalência, manifestações clínicas e tratamento. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 10, p. e3288, 2020.

SINGH, A.; KAUR, K.; KAUR, H.; MOHANA, P.; ARORA, S.; BEDI, N.; CHADHA, R.; BEDI, P. M. S. Design, synthesis and biological evaluation of isatin-benzotriazole hybrids as new class of anti-*Candida* agents. **Journal of Molecular Structure**. v. 1274, n. 2, p. 134456, 2023.

SOARES, D. M.; LIMA, E. O.; SOARES, D. M. M.; SILVA, N. F.; COSTA, N. G. M; FARIA, F. S. E. D. V.; R, RODRIGUEZ, A. F. R. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. **Brazilian journal of surgery and clinical research**. v. 2, n. 1, p. 28-34, 2019.

SUBERVIOLA, B. Clinical safety of liposomal amphotericin B. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 38, n. 2, p. 56-60, 2021.

TANGADANCHU, V. K. R.; SUI, Y.; ZHOU, C. Isatin-derived azoles as new potential antimicrobial agents: Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. v. 41, 2021.

TURAN, H.; DEMIRBILEK, M. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 50, n. 1, p. 62-69, 2018.

TURECKA, K.; CHYLEWSKA, A.; KAWAIAK, A.; WALERON, K. F. Antifungal activity and mechanism of action of the Co (III) coordination complexes with diamine chelate ligands against reference and clinical strains of candida spp. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.1-14, 2018.

VALENTE, A. D.; LOPES, T. C.; REIS, M. F. Comparação da sensibilidade e especificidade entre dois métodos de identificação de *Candida albicans*. **Centro científico conhecer**. v. 18, n. 35, 2021.

VALGUS, J. M. What's new in antifungals? **Current Infectious Disease Reports**, v. 5, n. 1, p. 16–21, 2003.

WANG, Y.; LU, C.; ZHAO, X.; WANG, D.; LIU, P.; SUN, S. Antifungal activity and potential mechanism of Asiatic acid alone and in combination with fluconazole against *Candida albicans*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 139, 2021.

WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesis. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 2 ed. London: Academic Press. 2008.

WHALEY, S. G.; ROGERS, P. D. Azole Resistance in *Candida glabrata*. **Current Infectious Disease reports**. v. 18, n, 41, 2016.

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

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

CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA

Anexo 1: artigo publicado na revista Journal of Molecular Structure.

Journal of Molecular Structure 1273 (2023) 134323

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstr

Deep eutectic solvent co-catalyzed synthesis and antimicrobial activity of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives

Sandro-Dutra de-Andrade^a, Isadora-Maria-Gouveia Andrade^a, Aleff Castro^a, Yohana-Maria-Rodrigues Montenegro^a, Dayse das-Neves-Moreira^a, Rachel-Azevedo Maia^b, Felipe-Terra Martins^c, Boniek-Gontijo Vaz^c, Gabriel Franco-dos-Santos^c, Edetrudes-de-Oliveira Lima^d, Nayana-da-Rocha Oliveira^d, Brenda-Kercya-da-Silva Farias^d, Claudio-Gabriel Lima-Junior^{a,*}

^a Laboratory of Medicinal Organic Synthesis of Paraíba (LASMOP), Department of Chemistry, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa-PB 58, 051-900, Brazil

^b Department of Chemistry, State University of Paraíba, Campina Grande-PB, 58409-500, Brazil

^c Institute of Chemistry, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia-GO 74, 690-900, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, (UFPB), João Pessoa-PB 58, 051-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 July 2022
Received in revised form 7 October 2022
Accepted 10 October 2022
Available online 12 October 2022

Keywords:
3-Substituted-2-hydroxy-2-isoxindoles
MBHR
C-C bond
Green solvents

ABSTRACT

A series of fourteen Morita-Baylis-Hillman adducts has been synthesized from isatin derivatives using deep eutectic solvents containing choline chloride (ChCl). Research results showed that the solvent based on ChCl/ethylene glycol (1:2) is a very effective alternative for the synthesis of adducts derived from acrylonitrile, resulting in compounds with excellent yields and short reaction times, after optimization of the catalyst (DABCO). Regarding the synthesis of adducts derived from methyl acrylate, the system ChCl/Urea (1:2) was the most effective, since it suppresses the formation of transesterification co-products between the adducts and the solvent. The use of these systems reduced the amount of catalyst required compared to literature data, acting as co-catalyst. The structure of a transesterification by-product was established by X-ray crystallography. The synthesized compounds were screened for antimicrobial activities. At a concentration of 32 µg/ml, the *N*-methylisatin/acrylonitrile adduct inhibited the growth of most microorganism species used in biological assays, showing bactericidal and fungicidal nature.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last two decades, an important decline in the worldwide incidence of infectious diseases caused by bacteria, fungi, viruses, and other parasitic species has been observed. These numbers reflect the result of a series of infection prevention and control strategies that include basic sanitation, water supply, safe food, vaccines and especially antibiotics. Diseases that used to be responsible for thousands of deaths, are now eradicated and many other communicable diseases have shown considerable reduction in cases in many countries [1,2]. Despite this advances, infectious diseases still pose a major threat to public health in the 21st century [3], for instance, the COVID-19 pandemic and the emerging global threat from Monkeypox.

Although bacterial infections are easier to treat than other microbial infections, in view of the arsenal of antibiotic agents available on the market [4], the drastic reduction of new drugs and investments for its development associated with the rapid growth of microbial resistance to antimicrobials constitutes a real threat with potentially devastating consequences, making the safe and effective treatment of these diseases a great challenge [5]. Seeking new low-cost antimicrobial compounds with greater safety and efficacy, researchers have resorted to classic strategies such as screening methods and chemical modification of known antimicrobial agents, as well as the development of hybrid agents, novel membrane-active drugs, and inhibitors of bacterial virulence and pathogenesis [6].

Against this background, Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR) is an important C-C bond-forming transformation which allows access to polyfunctionalized adducts with considerable synthetic potential and promise pharmacological profile [7–9]. Despite presenting the high atomic economy as one of its main advantages, this reaction often has low reaction rates and long reaction times [10]. The use of pressure [11], protic solvents

Anexo 2: artigo aceito para publicação na Revista Brazilian Journal of Biology.



[BJB] Decisão editorial

**Dr. Marcelo Augusto Esquisatto** <noreply.ojs2@scielo.org>  dom., 23 de jul., 13:28 (há 13 dias)   

para Lyvia, Francisco, Laísa, Helivaldo, Petrônio, Danilo, Darcí, Daniele, Danielle, Ana, Sarah, Anna, mim, Rafael, Ana, Edeltrudes ▼

Lyvia Layanne Silva Rosa, Francisco Patrício de Andrade Júnior, Laísa Vilar Cordeiro, Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho, Danilo Duarte de Assis Gadelha, Darcí de Magalhães Melo, Daniele de Figuerêdo Silva, Danielle da Nóbrega Alves, Ana Laura de Cabral Sobreira, Sarah Rebeca Dantas Ferreira, Anna Paula de Castro Teixeira, Brenda Kercya da Silva Farias, Rafael Gomes Firmino, Ana Karina Holanda Leite Maia, Edeltrudes de Oliveira Lima,

Chegamos a uma decisão sobre a sua submissão do artigo intitulado "Estudo de associação entre ceftriaxona e uma amida sintética contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*" ao *Brazilian Journal of Biology*.

A decisão é: Manuscrito aceito para publicação.

Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas

Brazilian Journal of Biology

Anexo 3: Capítulo de livro publicado

51

CAPÍTULO 5

PERFIL DE INTOXICAÇÕES PELA UTILIZAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS E BARBITÚRICOS NA PARAÍBA NO ANO DE 2020

PROFILE OF INTOXICATIONS THROUGH THE USE OF BENZODIAZEPINES AND BARBITURATES IN
PARAÍBA IN THE YEAR 2020

PERFIL DE INTOXICACIONES POR USO DE
BENZODIAZEPINAS Y BARBITÚRICOS EN PARAÍBA EN EL AÑO 2020

BRENDA KERCYA DA SILVA FARIAS

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-5936-2127>

MATHEUS MORAIS DE OLIVEIRA MONTEIRO

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-7199-8053>

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-6794-1601>

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

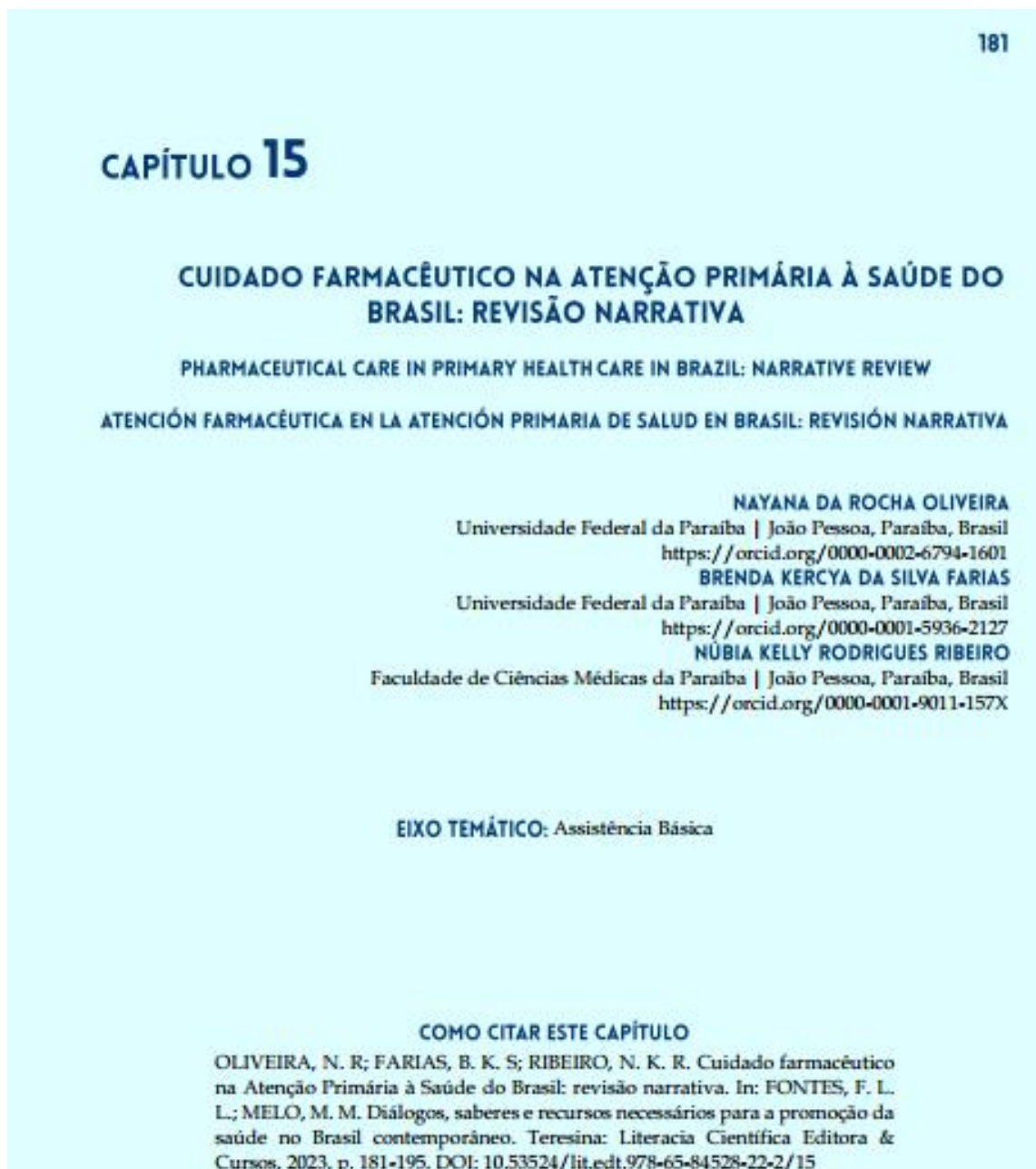
Universidade Federal do Rio Grande do Norte | Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-9051-1175>

EIXO TEMÁTICO: Políticas Públicas de Saúde

COMO CITAR ESTE CAPÍTULO

FARIAS, B. K. S. *et al.* Perfil de intoxicações pela utilização de benzodiazepínicos e barbitúricos na Paraíba no ano de 2020. *In:* FONTES, F. L. L.; MELO, M. M. Diálogos, saberes e recursos necessários para a promoção da saúde no Brasil contemporâneo. Teresina: Literacia Científica Editora & Cursos, 2023, p. 51-65. DOI: 10.53524/lit.edt.978-65-84528-22-2/05

Anexo 4: Capítulo de livro publicado.

Anexo 5: artigo submetido na EXCLI Journal.

3 de 5.632

[EXCLI] Submission acknowledgement to the non-corresponding authors

Caixa de entrada x



EXCLI Journal <excli@ifado.de>

para Rawny, Cássio, Bráulio, mim, Nayana, José, Edeltrudes ▾

sex., 4 de ago., 12:50 (há 19 horas) ☆ ↶ ⋮

Hello,

FRANCISCO PATRICIO DE ANDRADE JÚNIOR has submitted the manuscript, "Antifungal activity, Mechanism of action and molecular docking of citronellal against Trichophyton rubrum strains" to EXCLI Journal.

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

EXCLI Journal

EXCLI Journal

IfADo - Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, Dortmund
Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund/GERMANY

Anexo 6: artigo submetido na revista Fitos (Fiocruz).



[RF] Agradecimento pela submissão



revistafitos@far.fiocruz.br

para mim, Thompson, André, Emmanuel, Edeltrudes ▼

seq., 24 de jul., 07:25 (há 12 dias)



Olá,

Nayana da Rocha Oliveira submeteu o manuscrito "Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol e o efeito da sua associação com antifúngicos frente cepas de *Aspergillus niger*" à editora Revista Fitos.

Em caso de dúvidas, entre em contato. Agradecemos por considerar nossa editora como um veículo para seus trabalhos.

Equipe Editorial

Aviso de Confidencialidade: Esta mensagem contém informação confidencial e/ou privilegiada. Se você não for o destinatário, ou a pessoa autorizada a recebê-la, saiba que a leitura, cópia, reprodução e/ou divulgação das informações nela contidas são expressamente proibidas. Se você recebeu esta mensagem por engano, por favor, avise imediatamente ao remetente, respondendo o e-mail e, em seguida, apague-o. As opiniões aqui expressas, bem como os anexos são de total responsabilidade do autor.

Anexo 7: artigo do mestrado a ser submetido na revista Scientia Plena.



SCIENTIA PLENA
www.scientiaplena.org.br

VOL. X, NUM. X

202X

doi: 10.14808/sci.plena.202X.XXXXXX

Atividade antifúngica da 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-yl) acrilonitrila: uma nova molécula fungicida contra espécies de *Candida*

Antifungal activity of 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-yl) acrylonitrile: a new fungicidal molecule against *Candida* species

B. K. S. Farias^{1*}; N. R. Oliveira¹, Medeiros. C. A. C.¹, JÚNIOR, F. P. A.¹, B. A. Teixeira¹, ARAÚJO, E. M.¹, Lima-Junior. C. G.², GOMES, V. R. G.³, GOMES, V. T. V.³, E. O. Lima¹.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-900, João Pessoa-PB, Brasil

²Departamento de Química, Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-900, João Pessoa-PB, Brasil

³Departamento de Biotecnologia, Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), Centro de Biotecnologia (CBIOTEC), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-900, João Pessoa-PB, Brasil

*brenda1917@gmail.com

(Recebido em dia de mês de ano; aceite em dia de mês de ano)

O gênero *Candida* representa o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas nos seres humanos, porém, *C. albicans* e *C. glabrata* estão entre os agentes etiológicos mais frequentes na clínica. Essas espécies frequentemente estão envolvidas nos casos de infecção do trato urinário (ITU) adquiridas principalmente quando a quando há debilidade no sistema imunológico ou desequilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro. Diante da elevada resistência aos fármacos já utilizados na prática clínica, surge a necessidade da descoberta de novos agentes antifúngicos. Dessa forma, objetivamos avaliar a atividade do produto sintético derivado da isatina 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-yl)acrilonitrila contra *C. albicans* e *C. glabrata*. Para isso, foram realizados o ensaio de Concentração Inibitória e Fungicida Mínima (CIM/CFM), associação através do Método de *Checkerboard*, mecanismo de ação e inibição da formação do biofilme através do método de cristal violeta. 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-yl)acrilonitrila apresentou forte atividade antifúngica contra as espécies testadas, com valor de CIM de 64 µL/mL e CFM de 128 µL/mL, exibindo ação fungicida. A associação do produto com fluconazol e anfotericina B resultou em sinergismo para *C. albicans* e indiferença para *C. glabrata*. O mecanismo de ação fungicida envolve a sua atuação através da parede celular. Por último, a molécula apresentou inibição moderada na formação de biofilme para *C. albicans* ATCC-76485 e ausência de efeito frente *C. glabrata*. Os resultados apresentados demonstram a atividade antifúngica do produto nas metodologias avaliadas, podendo se tornar um forte candidato a fármaco para o tratamento de infecções do trato urinário ocasionada por essas espécies.

Palavras-chaves: *Candida*; isatina; antimicrobiano.