



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

BRÁULIO DE ALMEIDA TEIXEIRA

ATIVIDADES ANTIBIOFILME E FUNGICIDA DE 2-BROMO-N-FENILACETAMIDA FRENTE A *Candida* spp. FLUCONAZOL-RESISTENTES.

João Pessoa
2024

BRÁULIO DE ALMEIDA TEIXEIRA

ATIVIDADES ANTIBIOFILME E FUNGICIDA DE 2-BROMO-N-FENILACETAMIDA FRENTE A *Candida* spp. FLUCONAZOL-RESISTENTES.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacologia.

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

João Pessoa

2024

T266a Teixeira, Bráulio de Almeida.
Atividades antibiofilme e fungicida de
2-bromo-N-fenilacetamida frente a *Candida* spp.
fluconazol-resistentes / Bráulio de Almeida Teixeira. -
João Pessoa, 2024.
73 f. : il.

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

1. Fungicidas. 2. *Candida* spp. 3. Biofilme. 4.
Atividade antifúngica. 5. Resistência fúngica. I. Lima,
Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

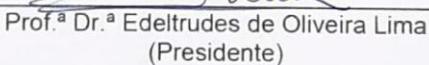
CDU 661.163.2 (043)

BRÁULIO DE ALMEIDA TEIXEIRA

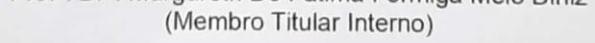
ATIVIDADES ANTIBIOFILME E FUNGICIDA DE 2-BROMO-*N*-
FENILACETAMIDA FRENTE A *Candida* spp. FLUCONAZOL-
RESISTENTES.

Aprovado em: 23 / 02 / 24

BANCA EXAMINADORA

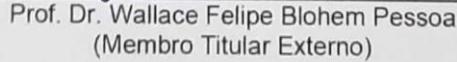


Prof.ª Dr.ª Edeltrudes de Oliveira Lima
(Presidente)



Prof.ª Dr.ª Margareth De Fatima Formiga Melo Diniz

(Membro Titular Interno)



Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa

(Membro Titular Externo)

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(Membro Suplente Externo)

Prof.^a Dr.^a Hilzeth de Luna Freire Pessoa
(Membro Suplente Externo)

À flor mais bonita do meu jardim, minha mãe, Margarida Maria de Almeida Teixeira (*in memoriam*), por quem eu incansavelmente lutei para que tivesse dias mais coloridos e alegres ao longo de toda sua vida;

À minha avó, Ercilia Ferreira de Almeida (*in memoriam*), exemplo de integridade e de docura, com a qual eu tinha uma imensa relação de paz e admiração;

E ao meu pai, Francisco de Assis Teixeira (*in memoriam*), alguém que eu gostaria de ter conhecido muito melhor,

eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Todo o caminho que percorri até aqui, definitivamente, não teria sido trilhado não fosse a bondade e infinita misericórdia de **Deus**, o maior, que olha com cuidado para os mais necessitados e nos dá permissão. Tudo a Ele!

Agradeço a **mim mesmo** que, apesar de muito independente desde sempre por força de necessidade, conciliando trabalho duro com estudo durante a graduação; e com um aprendizado tão intenso nesses dois anos de dedicação exclusiva ao mestrado, não desisti - mesmo quando tive todos os incontáveis motivos necessários para.

Agradeço muitíssimo também a minha orientadora, Professora Doutora **Edeltrudes de Oliveira Lima**, um exemplo de pessoa nas relações de trabalho e na vida, pela disponibilidade em me aceitar na orientação e pelos ensinamentos passados quando eu ainda estava dando os meus primeiros passos científicos.

Agradeço aos que me cederam um ombro quando, por muitas vezes em que me senti sozinho, eu quis chorar: meus amigos **Antônio Batista, Rafael Feliciano, Everton Queiroz e Thiele Carvalho**; meu primo (praticamente irmão) **Hemanoel Neto** e sua esposa **Núria Esther**.

Sou grato também aos colegas de laboratório e de bloco, seja pelos ensinamentos técnicos passados: **Francisco Andrade Júnior, André Azevedo, Nayana Rocha e Brenda Farias**; seja pelos momentos de distração e café: **Zu e José**. No nosso ambiente de trabalho nunca houve sequer uma única contenda porque trabalhávamos sempre na base do comprometimento, da conversa e da harmonia.

Meu muito obrigado à **Caroline Magueira**, secretária do PPgPNSB, por desempenhar seu trabalho de maneira bastante responsável, nos mantendo informados e lembrados dos prazos do Programa.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), bem como à Universidade Federal da Paraíba (**UFPB**), meu muito obrigado!

“When you play the Game of Thrones you win or you die.”

(A Song of Ice and Fire - George R. R. Martin)

Resumo

TEIXEIRA, B. A. Atividades antibiofilme e fungicida de 2-bromo-*N*-fenilacetamida frente a *Candida* spp. fluconazol-resistentes. 75p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos-Área de Concentração: Farmacologia) - CCS/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024.

Os microrganismos do gênero *Candida* são responsáveis por muitas entidades clínicas, envolvendo desde micoses localizadas a exemplo das onicomicoses, candidíases bucais e vulvovaginais a micoses sistêmicas como a candidíase disseminada. As espécies do gênero *Candida* estão entre os principais agentes responsáveis por óbitos cuja causa seja a infecção por fungos e merecem destaque *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) e *Candida parapsilosis*. Tais microrganismos também são lembrados por sua notável capacidade de resistência às drogas antifúngicas através de diversos mecanismos, a saber: vias metabólicas alternativas, formação de biofilmes, mutações nos genes para síntese de ergosterol e superexpressão de bombas de efluxo. A busca por novas moléculas antifúngicas sintéticas constitui-se como uma alternativa terapêutica neste cenário dada a possibilidade da descoberta de novas classes farmacológicas ou de novos esquemas de terapia combinada com os antifúngicos clássicos. Neste estudo foi investigado através de diferentes ensaios o perfil antifúngico de uma amida sintética, a 2-bromo-*N*-fenilacetamida, frente às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *N. glabratus* (*C. glabrata*) e *C. parapsilosis*. A molécula 2-bromo-*N*-fenilacetamida (“A1Br”) exibiu atividade fungicida, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 87,5% das cepas testadas e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 81,25% dos microrganismos. Também se mostrou um potente agente contra biofilmes maduros de *C. albicans*, cuja redução variou de 59-80%, estatisticamente tão significativa quanto a da anfotericina B (redução de 32-83%) na comparação de cada um desses tratamentos em relação ao grupo controle. Já quando associada aos antifúngicos licenciados fluconazol e anfotericina B a molécula “A1Br” exibiu efeitos indiferentes. Seu mecanismo de ação permanece passível de esclarecimento uma vez que não foram observadas alterações na sua CIM nos ensaios de sorbitol e ergosterol.

Palavras-chave: *Candida* spp.; 2-bromo-*N*-fenilacetamida; Atividade antifúngica; Biofilme; Resistência fúngica.

Abstract

TEIXEIRA, B. A. Fungicidal and antibiofilm activities of 2-bromo-*N*-phenylacetamide against fluconazole-resistant *Candida* spp.. 75p. Dissertation (Master's Degree in Natural Products and Bioactive Synthetics – Major Concentration: Pharmacology) – CCS/Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2024.

Microorganisms of the *Candida* genus are responsible for numerous clinical conditions, ranging from localized mycoses such as onychomycosis, oral candidiasis and vulvovaginal candidiasis to systemic mycoses like disseminated candidiasis. *Candida* spp. are among the primary agents causing death attributed to fungal infections with notable emphasis on species such as *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) and *Candida parapsilosis*. These microorganisms are also renowned for their remarkable resistance to antifungal drugs through various mechanisms, including alternative metabolic pathways, biofilm formation, mutations in genes for ergosterol synthesis and overexpression of efflux pumps. The search for new synthetic antifungal molecules represents a therapeutic alternative in this scenario, given the potential for discovering new pharmacological classes or new combined therapy schemes with classical antifungals. In this study, the antifungal profile of a synthetic amide, 2-bromo-*N*-phenylacetamide, was investigated against *C. albicans*, *C. tropicalis*, *N. glabratus* (*C. glabrata*) and *C. parapsilosis* through different assays. 2-bromo-*N*-phenylacetamide ("A1Br") exhibited fungicidal activity with a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 87.5% of the tested strains and a Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 81.25% of the microorganisms. It also proved to be a potent agent against mature biofilms of *C. albicans* with a reduction ranging from 59-80%, statistically as significant as that of amphotericin B (reduction of 32-83%) when comparing each of these treatments to the control group. When combined with the licensed antifungals fluconazole and amphotericin B the molecule "A1Br" exhibited indifferent effects. Its mechanism of action remains to be elucidated since no changes were observed in its MIC in sorbitol and ergosterol assays.

Keywords: *Candida* spp; 2-bromo-*N*-phenylacetamide; Antifungal activity; Biofilm; Fungal resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia de uma levedura à esquerda e de uma hifa à direita com inserção de imagem de uma colônia de hifas após crescimento por 5 dias.	16
Figura 2 – Morfologia de uma pseudo-hifa.	17
Figura 3 – Antifúngicos e seus mecanismos de ação.	21
Figura 4 – Mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos.	23
Figura 5 –Formação de biofilme em <i>Candida albicans</i>	24
Figura 6 – Reação de síntese de 2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1Br	2-bromo- <i>N</i> -fenilacetamida
ANOVA	Analysis of Variance
ATCC	American Type Culture Collection
CKB	Checkerboard
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
PBS	Phosphate-Buffered Saline
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 O gênero <i>Candida</i> : Biologia e importância clínica	16
2.2 O gênero <i>Candida</i> : dados epidemiológicos e diagnóstico laboratorial	19
2.3 Farmacologia dos antifúngicos e tratamento das infecções por <i>Candida</i> spp.	20
2.4 Perfil de resistência aos antifúngicos em <i>Candida</i> spp.	22
2.5 Biofilmes no gênero <i>Candida</i>	23
2.6 Amidas sintéticas: 2-bromo-N-fenilacetamida (A1Br)	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Local de trabalho	28
4.2 Espécies túngicas	28
4.3 Meios de cultura	28
4.4 Amida sintética 2-bromo-N-fenilacetamida e antifúngicos-padrão	29
4.5 Inóculo dos microrganismos	29
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	29
4.7 Estudo de associação pela Técnica <i>Checkerboard</i>	31
4.8 Estudos de possíveis mecanismos de ação antifúngica	31
4.8.1 Ensaio com sorbitol	31
4.8.2 Ensaio com ergosterol	32
4.9 Atividade antibiofilme de 2-bromo-N-fenilacetamida	33
4.10 Análises estatísticas	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES – CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA	69

1 INTRODUÇÃO

O Reino Fungi abrange os seres vivos com maior diversidade de espécies depois dos insetos. Com uma estimativa de milhões, este é o menos conhecido entre os três grandes Reinos de eucariotos, havendo até o momento em torno de apenas 150.000 espécies descritas (Wu *et al.*, 2019; Rokas, 2022).

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos e se apresentam na forma de leveduras ou de filamentos. As leveduras são estruturas unicelulares e os fungos filamentosos possuem forma complexa, caracterizando-se como estruturas tubulares formando o micélio. Embora a maioria dos fungos se apresente na natureza em sua forma filamentosa eles ainda podem ser classificados morfologicamente como termodimórficos, os quais se apresentam ora como leveduras ora como hifas, a depender da temperatura a que estão expostos. Possuem quitina na sua parede celular e glicogênio como molécula de reserva energética (Sidrim; Rocha, 2004). Estes microrganismos destacam-se no segmento farmacêutico como produtores de antibióticos, antioxidantes e antineoplásicos. Também têm importância na indústria alimentícia e nutracêutica, embora possam causar alergias, infecções, intoxicações e morte do hospedeiro (Arce-Torres *et al.*, 2020).

A espécie humana possui um aprimorado sistema de defesa tanto inata quanto adaptativa contra agentes invasores. Contudo, uma minoria de fungos consegue se enquadrar em 4 critérios elementares para invasão de um hospedeiro humano: a capacidade de se desenvolver em temperaturas iguais ou superiores a 37°C; a habilidade de chegar a tecidos internos penetrando ou driblando barreiras naturais do hospedeiro; a propriedade de digerir e absorver elementos constituintes dos tecidos humanos; e a resistência aos mecanismos de defesa do sistema imunológico do indivíduo (Köhler *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços na Ciência e na Medicina, tratamentos intensivos têm contribuído para perturbações no sistema imune (Köhler *et al.*, 2017). Também como consequência fungos oportunistas têm surgido como a maior causa em mortalidade, especialmente em indivíduos com doenças de base ou sob algum tratamento imunossupressor (Revie *et al.*, 2018).

Microrganismos dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* podem causar infecções com risco à vida (Strickland; Shi, 2021). Espécies desses gêneros, além do gênero *Cryptococcus*, incluem-se na categoria de agentes causadores predominantes em

micoses sistêmicas e ao todo respondem por mais de 90% das mortes cuja causa seja a infecção por fungos (Lee *et al.*, 2021).

Devido ao número limitado de alvos terapêuticos a resistência fúngica a medicamentos tem sido preocupante. A resistência a pelo menos uma classe de antifúngicos já torna a farmacoterapia um tanto limitada e a multirresistência pode tornar uma infecção fúngica impossível de ser tratada (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

Os fungos do gênero *Candida* são reconhecidos geralmente como alguns dos microrganismos com altas taxas de resistência aos antifúngicos. No Reino Fungi esta resistência pode acontecer devido a múltiplos fatores: diminuição da concentração do antifúngico, alterações no alvo terapêutico, ocorrência de vias metabólicas alternativas e formação de biofilmes (Ivanov; Ceric; Stojkovic, 2022; Kaur; Nobile, 2023).

O avanço da resistência aos antifúngicos trouxe a urgente necessidade de se pesquisar compostos bioativos com novos mecanismos de ação e a natureza é um recurso com ampla diversidade química, cujos produtos estão envolvidos em muitos processos biológicos e estão entre os agentes farmacológicos mais empregados na saúde humana (Heard; Wu; Winter, 2021; Augostine; Avery, 2022). Muitas substâncias químicas produzidas por bactérias, plantas, animais, espécies marinhas e outros vêm sendo estudadas pelo seu potencial antimicrobiano (Qadri *et al.*, 2022). A modelagem molecular, que é um processo no qual novos compostos são sintetizados a partir de protótipos ou de modelos químicos, cujas ações biológicas e propriedades são conhecidas, é a ferramenta mais utilizada na obtenção de novas drogas com maior segurança e eficácia. O produto final é estruturalmente similar à substância inicial (Katke *et al.*, 2011; Sampaio *et al.*, 2014; Bouz; Doležal, 2021).

Assim, dada a importância clínica dos fungos do gênero *Candida*, sua capacidade de desenvolver resistência frente aos antimicrobianos licenciados utilizados na terapêutica e a possibilidade de desenvolvimento de novos compostos bioativos com melhor atividade, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial antifúngico de uma amida sintética, a 2-bromo-*N*-fenilacetamida, sua associação com antifúngicos-padrão, seu mecanismo de ação e atividade antibiofilme.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O gênero *Candida*: Biologia e importância clínica

Os fungos do gênero *Candida* (fig. 1; fig. 2) são comensais na espécie humana e se dividem entre mais de 150 espécies, porém apenas algumas delas são patogênicas ao homem (Dahiya *et al.*, 2022). Estão entre as principais causas de infecção hospitalar (Mishra; Koh, 2021; Hameed *et al.*, 2021) e há um amplo espectro de micoses humanas causadas por tais espécies, sendo estas a quarta maior causa de infecções fúngicas da corrente sanguínea (Sun *et al.*, 2021). Não são raras também as infecções de pele e de unhas, como na candidíase cutânea e na candidíase mucocutânea crônica, causadas pelas espécies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) (Diongue *et al.*, 2018; Sadeghi *et al.*, 2019; Egri *et al.*, 2021; Chimenz *et al.*, 2022). Já na fungemia, *C. albicans* ainda é a espécie de levedura mais prevalente, seguida por *N. glabratus* (*C. glabrata*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) (Alp *et al.*, 2021; Hassan; Chew; Than, 2021). Esta primeira é também a espécie de *Candida* mais comumente encontrada na prática clínica (Moraes-Pinto; Ferrarini, 2020).

Figura 1 – Morfologia de uma levedura à esquerda e de uma hifa à direita com inserção de imagem de uma colônia de hifas após crescimento por 5 dias.

Fonte: Sudbery, 2011.

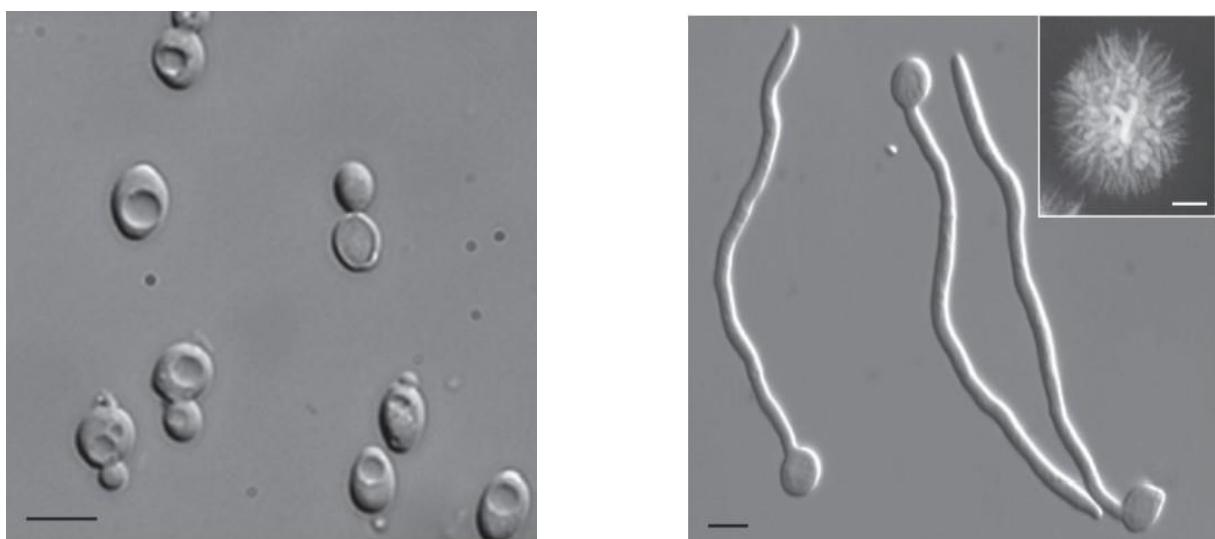


Figura 2 – Morfologia de uma pseudo-hifa.

Fonte: Sudbery, 2011.



Candida albicans é um microrganismo eucariótico de 5 µm de tamanho, forma esférica, com parede celular e um acentuado pleomorfismo, o que torna seus estudos morfológicos dispendiosos (Grigor'eva *et al.*, 2020). Compõe a microbiota bucal, conjuntival, gastrintestinal e geniturinária e pode causar tanto infecções superficiais quanto sepse em indivíduos imunocomprometidos. A transição mútua entre leveduras e hifas, a expressão de proteínas de adesão às superfícies celulares do hospedeiro, formação de biofilmes, mudança fenotípica e produção de hidrolases são amplos fatores de virulência e associados às características morfológicas previamente citadas justificam a numerosa quantidade de sítios de infecção (Pereira *et al.*, 2020).

A levedura *Candida parapsilosis* é também comensal na espécie humana e é amplamente distribuída na natureza, sendo frequentemente isolada de animais domésticos, solo, insetos e ambientes marinhos. Possui uma habilidade inata de aderência a superfícies sintéticas e dispositivos médicos implantáveis, inclusive com formação prévia de biofilmes em algumas situações. Uma vez maduros, essas estruturas diminuem consideravelmente a capacidade das drogas antifúngicas alcançarem as células fúngicas (Branco; Miranda; Rodrigues, 2023). Embora resultem em risco de morbimortalidade diminuído quando comparadas às infecções por *C. albicans*, aquelas causadas por *C. parapsilosis* estão em grande parte relacionadas com isolados clínicos menos susceptíveis a equinocandinas e aos azólicos, o que muito dificulta a terapia antimicrobiana (Tóth *et al.*, 2019; CDC, 2020).

Semelhantemente às duas espécies anteriores, *N. glabratus* (*C. glabrata*) pode colonizar o intestino, o trato geniturinário e a mucosa bucal de indivíduos humanos. Em condições de imunossupressão este microrganismo pode causar tanto infecções mucocutâneas quanto invasivas devido a inúmeros fatores de virulência como a

formação de biofilmes espessos, por exemplo. As leveduras deste gênero possuem uma susceptibilidade intrinsecamente diminuída ao fluconazol e podem ainda adquirir resistência cruzada a outros azólicos. Também têm sido relatados casos de resistência a equinocandinas e poliênicos (Frías-De-León *et al.*, 2021; Martínez-Herrera *et al.*, 2022). *N. glabratus* (*C. glabrata*) é a segunda espécie de *Candida* mais frequente em pacientes na fungemia (Hassan; Chew; Than, 2021).

Quanto à *Candida tropicalis*, sabe-se que é uma levedura prevalente em regiões tropicais e subtropicais e pode ser encontrada tanto em ecossistemas terrestres quanto aquáticos. Também é comensal da espécie humana, tendo sido já encontrada na cavidade bucal, trato gastrintestinal e sistema geniturinário de indivíduos saudáveis e pode ser o agente etiológico de micoses superficiais e sistêmicas (Xu, 2021; Zhai *et al.*, 2021). Semelhante ao relatado em outras espécies do gênero *Candida*, *C. tropicalis* pode apresentar resistência aos azólicos, principalmente ao fluconazol (Pristov; Ghannoum, 2019; Wang *et al.*, 2021) e também à anfotericina B (Arastehfar *et al.*, 2020).

Os microrganismos do gênero *Candida* estão envolvidos em micoses superficiais atingindo áreas intertriginosas como as inguinais, as inframamárias, regiões entre os dedos e entre os glúteos. Também acometem as unhas e regiões periungueais. As principais espécies isoladas em tais manifestações clínicas são *C. albicans*, *C. tropicalis* e aquelas pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* (Silva-Rocha; de Azevedo; Chaves, 2017; Gawaz; Weisel, 2018).

Em relação ao trato geniturinário, sabe-se que a microbiota vaginal é composta sobretudo por espécies do gênero *Lactobacillus*, chegando a aproximadamente 70% dos microrganismos totais. Nas condições de desequilíbrio dessa microbiota, porém, pode ocorrer o crescimento exacerbado de *Candida* spp., sendo a espécie *C. albicans* a principal causadora da vaginose. A vaginose é uma disbiose causada na vagina quando da multiplicação exacerbada de patógenos oportunistas, incluindo-se os fungos; e é a causa principal de consultas ginecológicas todos os anos. Quando acompanhada de inflamação, recebe o nome de vaginite (Mohankumar *et al.*, 2022).

Os sinais/sintomas da candidíase são corrimento branco grumoso, ardor, vermelhidão e coceira na região vulvovaginal, além de dor na relação sexual. Acredita-se que a maioria dos episódios esteja relacionada com o uso de antibióticos, níveis aumentados de estrogênio, diabetes mellitus descompensado, atividades sexuais e roupas apertadas (Yano *et al.*, 2019). A candidíase vulvovaginal é o segundo mais

importante tipo de vaginose após a vaginose bacteriana e estima-se que 75% das mulheres tenham vivido episódios de candidíase pelo menos uma vez na vida (Mohankumar *et al.*, 2022).

Outra condição clínica bastante comum causada por fungos do gênero *Candida* é a candidíase bucal, que se caracteriza como a infecção da região orofaríngea. O principal agente etiológico é também *C. albicans*. Há outras espécies envolvidas, embora com menor frequência, são elas *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis* e *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). A maioria dos pacientes acometidos por essa micose tem certo grau de imunossupressão, a saber: indivíduos com AIDS ou indivíduos que estejam em tratamento quimioterápico, a depender do tempo, dose e droga de escolha (De Paiva *et al.*, 2022).

2.2 O gênero *Candida*: dados epidemiológicos e diagnóstico laboratorial

Em um estudo retrospectivo no estado de Alagoas (considerando os anos de 2009 a 2016) houve 3776 amostras positivas para micoses, de vários sítios de infecção. Deste total, 1593 amostras eram de secreção vaginal. Os agentes identificados foram: *Candida spp.* (53,9%), *C. albicans* (41,7%), *C. tropicalis* (0,3%) e *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) (4,1 %) (Maranhão *et al.*, 2019). Corroborando os achados no estudo brasileiro, um estudo português realizado com 470 participantes sintomáticos e assintomáticos mostrou que *C. albicans* (59%) foi a espécie mais prevalente entre os indivíduos (Fernandes *et al.*, 2022).

Um estudo indiano mostrou incidência de *C. albicans* também em indivíduos diabéticos. A população foi de 470 indivíduos, sendo 104 (22,1%) destes acometidos por candidíase bucal. *C. albicans* foi o microrganismo mais frequente, sendo responsável por 97,1% dos casos (Duggal *et al.*, 2021).

Um trabalho do tipo retrospectivo realizado no Irã mostrou que os microrganismos do gênero *Candida* corresponderam a mais de 70% dos fungos no grupo das leveduras causadoras de micoses superficiais. Dos 750 isolados clínicos, 432 (57,7 %) eram leveduras e 304 destas pertenciam ao gênero *Candida* (Khodadaqi *et al.*, 2021).

As provas atuais para detecção das infecções fúngicas se baseiam em métodos microbiológicos e histopatológicos. Apesar do tempo de processamento e da pouca sensibilidade as culturas micológicas continuam sendo o padrão-ouro para diagnóstico das infecções fúngicas em muitos contextos e possuem um importante

papel também nos testes de susceptibilidade a antifúngicos *in vitro*. Embora outros métodos não estejam disponíveis amplamente eles também possuem importância na tomada de decisões relacionadas a micoses dada a sua rapidez e sensibilidade. São eles: os ensaios imunológicos com anticorpos, com antígenos fúngicos e a detecção de ácidos nucléicos (Terrero-Salcedo; Powers-Fletcher, 2020).

A microscopia e a cultura são as formas clássicas de diagnóstico laboratorial para espécies de *Candida*. Porém, em se tratando da candidemia, devido a competição dos fungos com outros microrganismos, sugere-se que sejam utilizados meios de cultura seletivos. A candidíase invasiva não acompanhada de infecção da corrente sanguínea pode ser diagnosticada através de cultura e/ou exames histopatológicos de amostras intra-abdominal e intratorácica (Pappas *et al.*, 2018).

Quanto à candidíase vaginal, pode ser diagnosticada pela visualização de pseudo-hifas em preparações com KOH provenientes de mulheres com sintomas clássicos (Paladine; Desai, 2018); já infecções do trato urinário por *Candida* podem ser diagnosticadas com o uso de meios tradicionais em Micologia como Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), ágar batata dextrose, ágar nutritivo com ou sem antibacterianos e ágar cromogênico. As amostras são incubadas aerobicamente em temperaturas de 35 a 37°C por 24 a 48 horas e aqueles microrganismos de crescimento lento podem permanecer em temperatura ambiente por 1 semana. O diagnóstico laboratorial da candidúria se dá pela presença de mais de 1×10^4 UFC/mL (Gharaghani *et al.*, 2018).

Por fim, para a candidíase bucal, o diagnóstico laboratorial se dá por amostras de swab, imprint ou bochecho com solução salina, semeadas em ASD a 37°C pelo mesmo período. Também podem ser usados métodos suplementares, como algumas provas bioquímicas (Lewis; Williams, 2017).

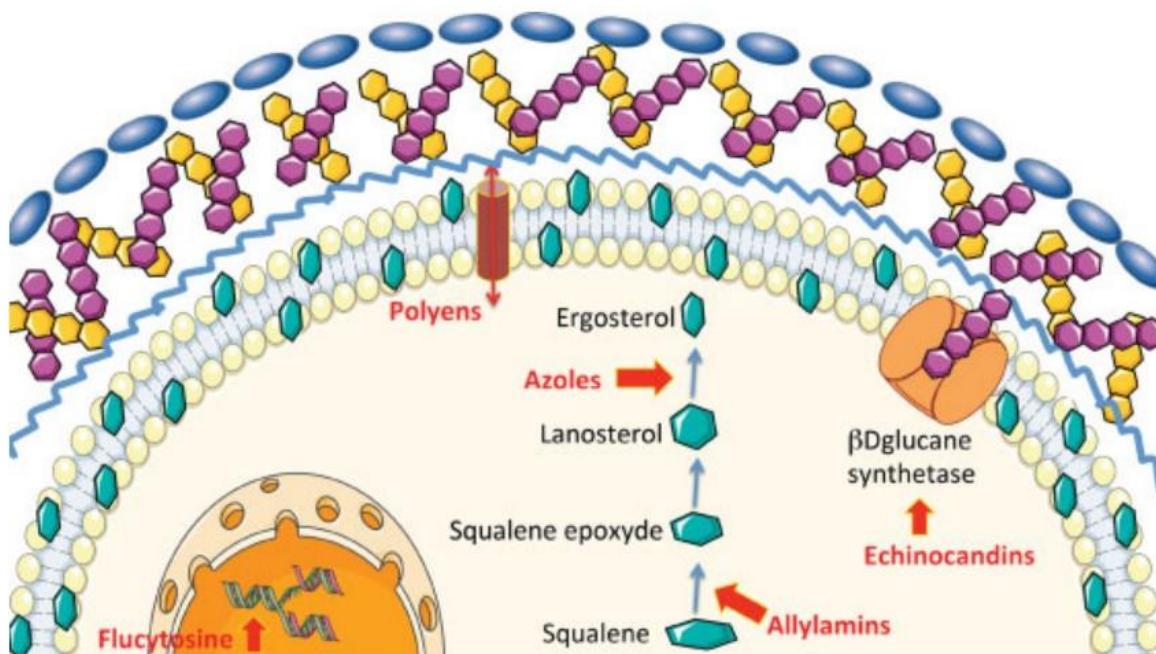
2.3 Farmacologia dos antifúngicos e tratamento das infecções por *Candida* spp.

O desenvolvimento de drogas antifúngicas é limitado dado que há grande similaridade entre as células do microrganismo e de seu hospedeiro. Logo, há uma busca por fármacos cujos alvos sejam a parede celular ou o ergosterol (Campoy; Adrio, 2017). Entre as classes há os azóis, polienos, equinocandinas, pirimidinas e alilaminas (fig. 3). Os azóis inibem a síntese de uma enzima envolvida com a produção do ergosterol, a lanosterol 14 α -desmetilase. Os polienos se ligam ao ergosterol na bicamada lipídica da célula fúngica, ocasionando a formação de poros e,

consequentemente, o extravasamento de material intracelular. Já as equinocandinas atuam pela inibição da enzima responsável pela síntese da β -1,3-glicana, essencial para a parede celular fúngica, a β -1,3-glicana sintase. Contrastando com o mecanismo de ação das três classes citadas, há ainda o das fluoropirimidinas. A 5-fluorocitosina entra na célula fúngica pelo transportador de citosina e é metabolizada a 5-fluorouracil, a qual se liga ao RNA e inibe a atividade da timidilato sintase, enzima fundamental para a produção de DNA. Por fim, as alilaminas também atuam pela inibição da síntese do ergosterol, inibindo a esqualeno epoxidase, que converte o esqualeno em esqualeno-2,3-epóxido. Desta forma, há um acúmulo de esqualeno na célula fúngica, o que causa desequilíbrio no pH e perturbações em proteínas de ligação à membrana (Kumar; Jha, 2017; Salazar *et al.*, 2020; Nivoix; Ledoux; Herbrecht, 2020; Murphy; Bicanic, 2021).

Figura 3 – antifúngicos e seus mecanismos de ação.

Fonte: Nivoix; Ledoux; Herbrecht, 2020.



O tratamento de primeira escolha para candidíase invasiva, segundo a Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas e a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, é a administração de equinocandinas (Yassin *et al.*, 2021; Fly *et al.*, 2022; Barantsevich, N.; Barantsevich, L., 2022). No caso da

candidíase bucal, a Organização Mundial de Saúde orienta a administração oral de nistatina 100.000 UI 3x ao dia, por 7 dias ou o uso de violeta de genciana (Tilly; Tharmalingam, 2022). Já para a candidíase vulvovaginal o tratamento segundo recomendações dos Centros para a Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2021) é a base de clotrimazol, miconazol, tioconazol, terconazol ou butoconazol intravaginais por até 7 dias; ou fluconazol via oral em dose única.

Por fim, a anfotericina B também pode ser utilizada no combate a leveduras do gênero *Candida* (Pappas *et al.*, 2004; Ito; Hooshmand-Rad, 2005; SES-DF, 2018; Grela *et al.*, 2019; Bezerra *et al.*, 2020).

2.4 Perfil de resistência aos antifúngicos em *Candida* spp.

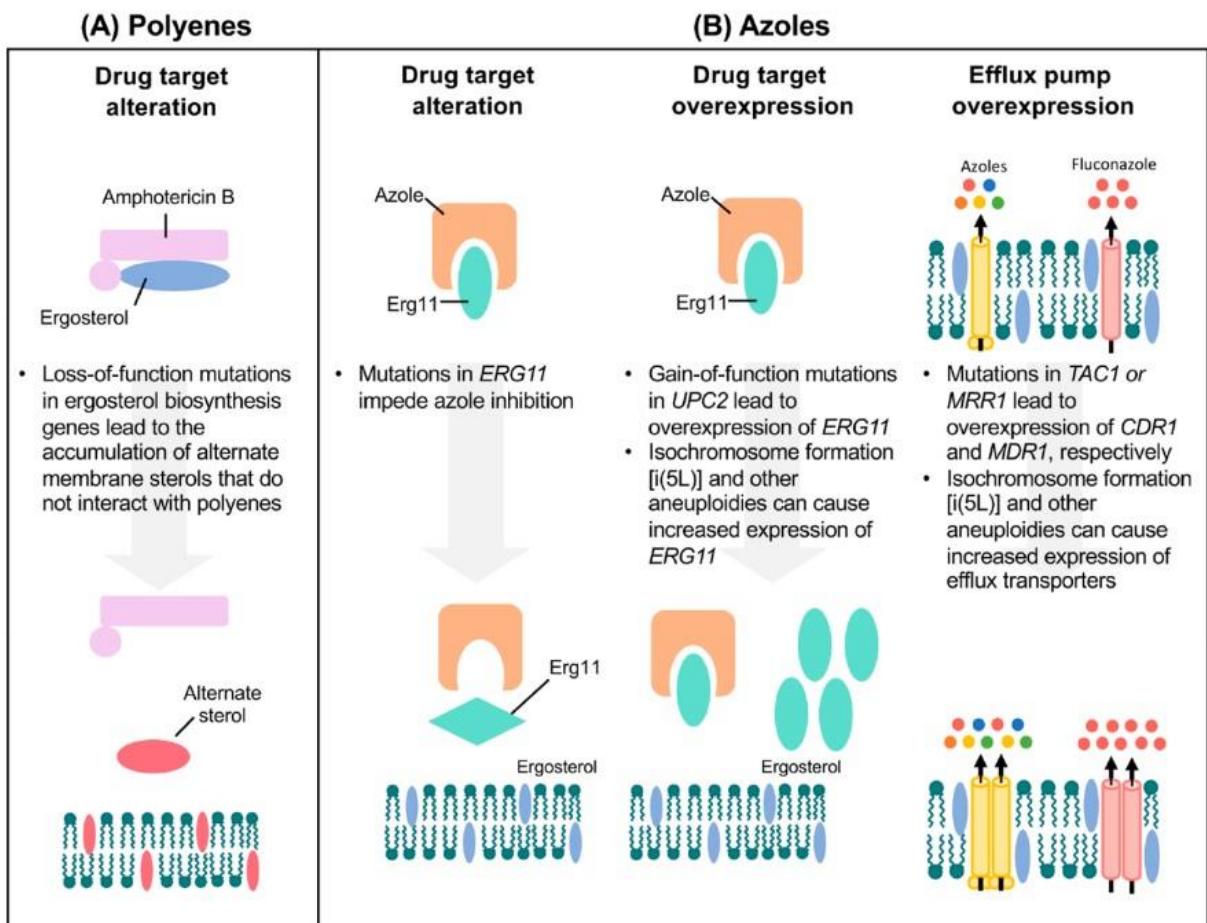
A resistência aos antifúngicos pode ocorrer: por meio de substituição de aminoácidos em proteínas importantes para a síntese de componentes estruturais, de modo a diminuir a afinidade de ligação destas com as drogas utilizadas na terapêutica; pela ocorrência de mutações do tipo ganho de função que levam a superexpressão do gene ERG11; por suprarregulação de bombas de efluxo, as quais conduzem os fármacos para o ambiente extracelular; e pela modulação de respostas a estresse ambiental, incluindo o estresse químico causado pelas drogas antifúngicas (fig. 4) (Lee *et al.*, 2021). São conhecidas ainda linhagens resistentes devido a formação de biofilme com maiores quantidades de proteínas e carboidratos totais (Fernandes; Silva; Henriques, 2015).

Particularmente, em *Candida* spp. a resistência aos azóis ocorre principalmente pelo efluxo aumentado de drogas da célula fúngica (Fisher *et al.*, 2022). A depender do sítio de infecção o perfil de resistência pode variar, sendo menor na candidemia e maior na candidíase bucal, o qual depende de terapias anteriores com o fluconazol e de candidíases bucais prévias (Whaley *et al.*, 2017). Na candidíase vulvovaginal a resistência ao fluconazol é rara, embora possa ocorrer quando da exposição repetida à droga (Sobel, J.; Sobel, L., 2018). Semelhantemente, têm sido relatados casos de resistência a equinocandinas ou mesmo a múltiplas drogas devido ao uso prolongado de fármacos desta classe (Coste *et al.*, 2020; Tortorano *et al.*, 2021).

A resistência à anfotericina B, embora relativamente rara, pode ocorrer em espécies de *Candida* (Fisher *et al.*, 2022). Dá-se por mutações do tipo perda de função em genes da biossíntese do ergosterol, as quais levam à produção de esteróis

Figura 4 – Mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos.

Fonte: adaptado de Lee *et al.* (2021).



alternativos que não interagem efetivamente com os polienos (Lee *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2022).

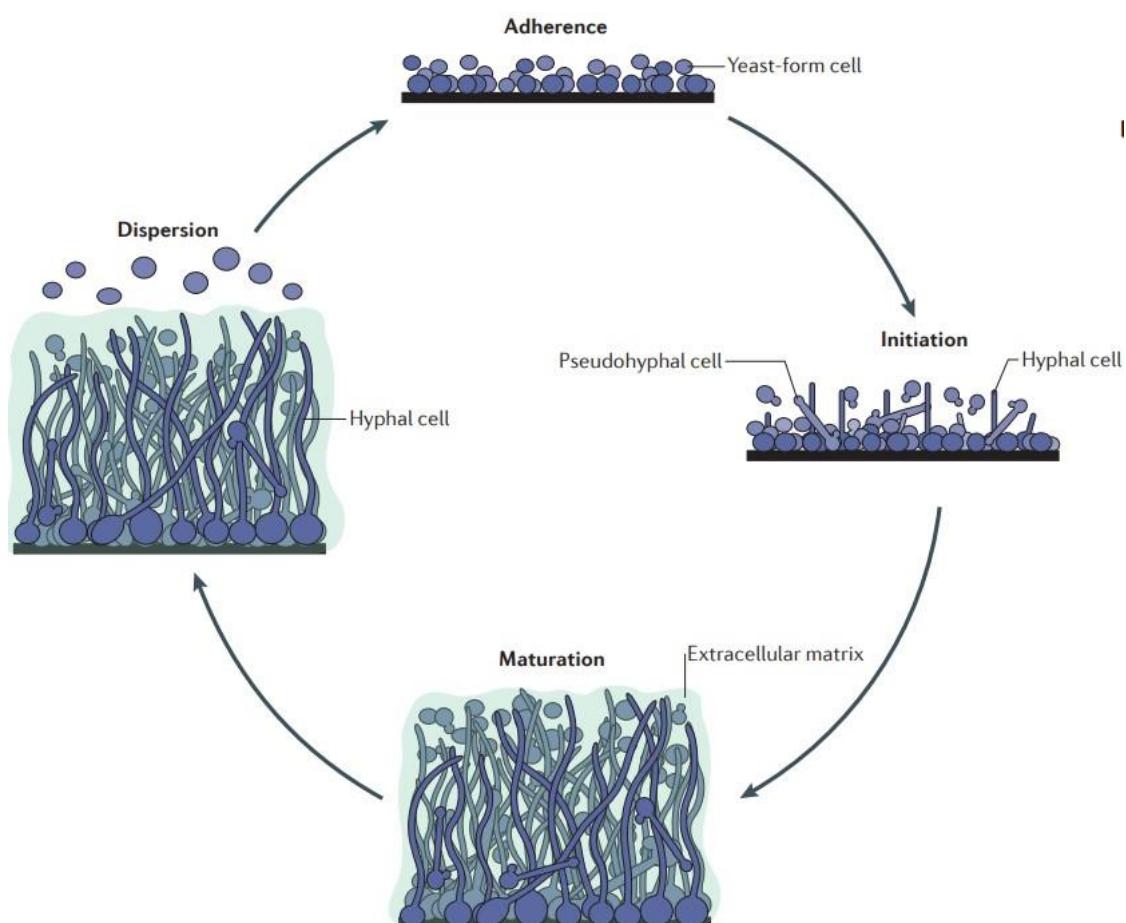
2.5 Biofilmes no gênero *Candida*

Biofilmes fúngicos são estruturas tridimensionais heterogêneas, multicelulares, compostas tanto por hifas quanto por leveduras envoltas em uma matriz extracelular. Tal matriz é composta por proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos sintetizados pelos próprios fungos e confere a estes proteção contra uma gama de estresses ambientais (fig. 5) (Gupta; Pruthi; Poluri, 2020).

O ciclo de desenvolvimento de um biofilme começa com a aderência dos microrganismos a uma superfície. O biofilme passa por uma iniciação, cresce devido a uma coagregação microbiana e à formação de matriz extracelular e passa por um estágio de maturação, que é caracterizado por trocas microbianas tanto genéticas quanto metabólicas e por controle de crescimento via auto-indutores (quorum-sensing). Em seguida, há invasão e destruição de tecidos do hospedeiro, desagregação e dispersão de microcolônias e/ou células planctônicas, as quais reiniciarão o ciclo (Polke; Hube; Jacobsen, 2015; Chevalier; Ranque; Prêcheur, 2017; Lohse *et al.*, 2018; Butassi *et al.*, 2021; Krukiewicz *et al.*, 2022).

Figura 5 – Formação de biofilme em *Candida albicans*.

Fonte: adaptado de Lohse *et al.* (2018).



Sabe-se que a formação de biofilmes é presente nas espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *N. glabratus* (*C. glabrata*) (Fernandes; Silva; Henriques,

2015; Polke; Hube; Jacobsen, 2015; Pereira *et al.*, 2020; Gómez-Molero *et al.*, 2021; Gupta, P.; Gupta, H; Poluri, 2021; Gómez-Casanova *et al.*, 2022).

2.6 Amidas sintéticas: 2-bromo-*N*-fenilacetamida (A1Br)

O surgimento e disseminação de patógenos resistentes têm contribuído para uma eficácia diminuída dos antimicrobianos, o que indica a necessidade de uma descoberta contínua de novos compostos bioativos naturais ou sintéticos com maiores eficácia e segurança (Demchenko *et al.*, 2021).

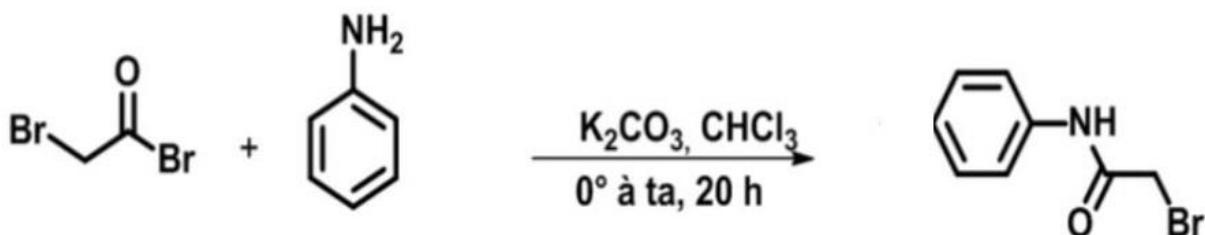
As amidas têm desempenhado um papel importante na história dos pesticidas. Após a descoberta da carboxina em 1966 surgiram diversas outras amidas fungicidas, modificadas estruturalmente, como o benodanil, furcarbanil e mebenil. Hoje, esta classe é extensamente utilizada no controle de doenças causadas por bactérias e fungos fitopatogênicos (Wang *et al.*, 2015).

A amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida, referida como “A1Br” (fig. 6), teve sua síntese realizada no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica da UFPB, baseando-se em vias sintéticas já descritas nos trabalhos de Xie *et al.* (2007).

O procedimento sintético realizado esteve de acordo com o que foi descrito por Sousa e Lima (2019), em que foram adicionados lentamente 4,84 g (0,024 mol) de brometo de bromoacetila a 1,86 g (0,020 mol) de anilina e 3,31 g (0,024 mol) de carbonato de potássio, solubilizado em 20 ml de clorofórmio a 0°C em um balão de 50 ml. Em seguida, a reação se manteve sob agitação por 20 horas em temperatura ambiente. A mistura reacional foi analisada por cromatografia de camada delgada (hexano/acetato de etila 1:1) e extraída posteriormente. Lavou-se a fase orgânica com água (3 x 25ml), secou-se em sulfato de sódio anidro e esta depois foi concentrada a uma pressão reduzida, resultando em um precipitado. Seguiu-se com sua purificação através de recristalização em etanol/água (rendimento de 83%) e sua estrutura química foi confirmada por espectrômetro FTIR modelo IRPrestige-21, Shimadzu, com acessório de reflectância total atenuada. Já o espectro de RMN ¹H foi obtido em aparelho Bruker a 400MHz; ponto de fusão: 130-132°C.

Figura 6 – Reação de síntese de 2-bromo-*N*-fenilacetamida.

Fonte: Sousa; Lima, 2019.



Estudos anteriores com o A1Br mostraram atividade antifúngica contra microrganismos dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida* e *Microsporum* (Rodrigues; Lima, 2019; Sousa; Lima, 2019; Andrade-Júnior; Lima, 2020; Melo *et al.*, 2021).

A terapia combinada de fármacos tem se mostrado uma estratégia promissora no combate às infecções fúngicas. Sua principal vantagem em relação às terapias isoladas é a redução ou mesmo a completa prevenção da indução de resistência por parte dos microrganismos, já que há uma redução da pressão seletiva em suas células. A terapia combinada também mostra que um mesmo fármaco pode ser utilizado em concentrações menores reduzindo, assim, a sua dose terapêutica (Spitzer; Robbins; Wright, 2017; Jezikova *et al.*, 2019; Calzetta, 2021).

São conhecidos trabalhos que fazem referência às associações de fármacos, de extratos vegetais ou de ambos, resultando em uma maior eficácia terapêutica frente a espécies fúngicas, inclusive no gênero *Candida* (Sun *et al.*, 2016; Katragkou *et al.*, 2017; Spitzer; Robbins; Wright, 2017; Glampedakis *et al.*, 2018; Jafri; Ahmad, 2019; Xiang *et al.*, 2020; Kay *et al.*, 2021).

Diante disto, o presente trabalho visou ao estudo da atividade antifúngica de 2-bromo-*N*-fenilacetamida (A1Br), sua associação com antifúngicos-padrão, mecanismo de ação e potencial antibiofilme frente a isolados clínicos de *Candida spp.* fluconazol-resistentes., a fim de que se possa contribuir para o desenvolvimento subsequente de uma alternativa terapêutica contra as infecções causadas por estes microrganismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a atividade antifúngica de 2-bromo-*N*-fenilacetamida frente a isolados clínicos do gênero *Candida*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 2-bromo-*N*-fenilacetamida;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 2-bromo-*N*-fenilacetamida;
- Investigar qual tipo de associação tal produto-teste possui com os antifúngicos-padrão fluconazol e anfotericina B (se sinérgica, antagônica ou indiferente) por meio da Técnica de Checkerboard (CKB);
- Investigar o mecanismo de ação da 2-bromo-*N*-fenilacetamida sobre a célula fúngica por meio dos ensaios preditivos com sorbitol e ergosterol;
- Testar a atividade antibiofilme de 2-bromo-*N*-fenilacetamida frente a *Candida albicans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de trabalho

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

4.2 Espécies fúngicas

As cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *N. glabratus* (*C. glabrata*) e *C. parapsilosis* utilizadas neste estudo pertencem ao Laboratório de Pesquisa da Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPB. As amostras das leveduras foram mantidas em tubos de ensaio (15 x 150 mm) contendo ágar Sabouraud dextrose inclinado (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), sob refrigeração (8º C), até o momento da realização dos experimentos. As cepas utilizadas foram: *C. albicans*: ATCC-76645, LM-200 (unhas), LM-44 (urina), LM-35 (unhas), LM-20 (pulmão), LM-32 (pulmão); *C. tropicalis*: ATCC-750, LM-17 (mucosa bucal), LM-135 (unhas), LM-165 (pulmão); *N. glabratus* (*C. glabrata*): ATCC-90030, LM-218 (secreção vaginal), LM-46 (boca); e *C. parapsilosis*: ATCC-22019, LM-439 (mucosa bucal), LM-689 (sangue). Cadastro SIGEN: AEFED60.

4.3 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para a manutenção das leveduras foi Ágar Sabouraud Dextrose/ASD (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Para os ensaios de atividade antifúngica foi empregado o meio Roswell Park Memorial Institute/RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil). Já para os ensaios de mecanismo de ação e atividade antibiofilme de 2-bromo-*N*-fenilacetamida foi utilizado o Caldo Sabouraud Dextrose/CSD (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave (exceto RPMI), a 121ºC por 15 minutos, seguindo as recomendações dos respectivos fabricantes.

4.4 Amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida e antifúngicos-padrão

A amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida foi sintetizada pelo Dr. Helivaldo Diógenes da Silva Souza, sob supervisão do professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB.

A molécula 2-bromo-*N*-fenilacetamida e os antifúngicos-padrão anfotericina B e fluconazol (Sigma Aldrich® Brasil Ltda.) foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *N. glabratus* (*C. glabrata*) e *C. parapsilosis*. Os produtos foram pesados para uma concentração inicial de 1.024 µg/mL, devidamente solubilizados em 150 µL (3%) de dimetilsulfóxido (DMSO) e 100 µL (2%) de Tween 80, completando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL. A partir da concentração inicial do sintético, de 1.024 µg/mL foi realizada uma diluição seriada até 4 µg/mL, enquanto que os antifúngicos-padrão foram diluídos até 0,5 µg/mL (Cleeland; Squires, 1991; Pereira *et al.*, 2011; Hadacek; Greger, 2000).

4.5 Inóculo dos microrganismos

Para a preparação do inóculo foi realizado repique das cepas em ASD e incubação a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 24-48h para que atingissem crescimento apropriado. As suspensões dos repiques foram preparadas cobrindo as colônias com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v - Labsynth®), agitando-as suavemente e fazendo raspagem das mesmas com o auxílio de uma alça de platina. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio de um vortex. Após agitação, cada suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800) de acordo com o padrão 0,5 McFarland, o qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. A quantificação dos inóculos foi confirmada por meio da contagem celular em câmara de Neubauer (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek; Greger, 2000; Sahin *et al.*, 2004; CLSI, 2008).

4.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos estabelecidos por Cleeland e Squires (1991), Eloff (1998) e pelo CLSI

(2008). A determinação da CIM das amostras sobre as cepas fúngicas foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, usando placa (ALAMAR®) para microdiluição contendo 96 poços com fundo em “U”. De início, foram distribuídos 100 μ L de RPMI 1640 duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μ L dos produtos solubilizados (duplamente concentrados) foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois foram obtidas as concentrações de 1024 até 4 μ g/mL (sintético) ou até 0,5 μ g/mL (antifúngicos-padrão). Por fim, foram adicionados 10 μ L das suspensões das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, respectivamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados: controle dos microrganismos, a fim de ratificar a viabilidade das cepas em estudo; controle de esterilidade do meio de cultura RPMI 1610; e controles com anfotericina B e fluconazol para inibição dos fungos. As placas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35 +/- 2°C por 48 horas.

O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos, 50% dos microrganismos utilizados nos ensaios (Cleeland; Squires, 1991; Hafidh *et al.*, 2011) e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) interpretada de acordo com os seguintes critérios: até 600 μ g/mL = forte atividade; 600 – 1500 μ g/mL = moderada atividade; > 1500 μ g/mL = fraca atividade ou produto inativo (Holetz *et al.*, 2002; Sartoratto *et al.*, 2004; Houghton *et al.*, 2007).

Após a definição da CIM, 10 μ L do sobrenadante de cada cavidade onde houve inibição visível do crescimento fúngico (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram adicionados a novos poços de microplacas contendo 100 μ L de RPMI 1640. Estas foram incubadas a 35 \pm 2°C por 24-48h. A CFM foi considerada como sendo a menor concentração do produto teste capaz de inibir completamente o crescimento dos microrganismos. Também foi avaliado o caráter antifúngico da substância-teste através da relação CFM/CIM, metodologia esta utilizada por Hafidh e colaboradores (2011), para especificar a natureza do efeito antimicrobiano, considerada como fungicida quando a razão CFM/CIM variou de 1/1 a 2/1. Por outro lado, se a proporção foi maior que 2/1, é mais provável que o efeito do produto em questão tenha sido fungistático. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM obtidas nos três ensaios (Salie; Esgles; Leng, 1996; Ncube; Afolayan; Okoh, 2008; Balouiri; Sadiki; Ibsouda, 2016).

4.7 Estudo de associação pela Técnica Checkerboard (CKB)

O efeito da associação do produto sintético com os antifúngicos licenciados foi analisado através da técnica *checkerboard*. Para a realização desse ensaio foram utilizadas placas para microdiluição contendo 96 cavidades com fundo em “U” (ALAMAR®), nas quais 100 µL do RPMI 1640 foram adicionados em seus poços. Em seguida, 50 µL do produto sintético em diversas concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8) foram distribuídos no sentido vertical e 50 µL do primeiro antifúngico de escolha, também em diferentes concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8), foram adicionados no sentido horizontal da placa de microdiluição. O mesmo procedimento foi realizado com o segundo antifúngico de escolha. Por fim, foram acrescentados 20 µL da suspensão fúngica, previamente ajustados de acordo com o padrão 0,5 McFarland. As placas foram incubadas a 35 ± 2°C e após 24-48 horas foi realizada a leitura para observar a presença ou não do crescimento fúngico visível (White *et al.*, 1996). Em paralelo, foram utilizados como controle de esterilidade o meio RPMI na ausência das suspensões fúngicas; e como controle de viabilidade dos fungos ensaiados o RPMI 1640 acrescido dos inóculos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Visando à avaliação da atividade das associações das moléculas em estudo, foi calculado o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), em que $ICIF = CIF_A + CIF_B$, onde A representou a primeira substância e B a segunda substância. O $CIF_A = CIM_A$ combinado / CIM_A isolado, enquanto que o $CIF_B = CIM_B$ combinado / CIM_B isolado. O ICIF foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo ($\leq 0,5$), indiferença ($> 5,0$ e $\leq 4,0$) ou antagonismo ($> 4,0$) (Lewis *et al.*, 2002; Odds, 2003; Shin, 2003; Correa-Royer *et al.*, 2010).

4.8 Estudos de possíveis mecanismos de ação antifúngica

4.8.1 Ensaio com sorbitol

A fim de se investigar um possível efeito do produto teste na integridade da parede celular fúngica, o meio de cultura CSD foi suplementado com sorbitol, um estabilizador osmótico para protoplastos. A determinação da CIM dos produtos na presença do sorbitol foi realizada pela técnica de microdiluição utilizando placas com fundo em “U” contendo 96 cavidades (ALAMAR®), semelhante ao que já foi descrito

anteriormente e em triplicata. Em cada orifício da placa foram adicionados 100 µL do meio líquido CSD previamente suplementado com sorbitol (PM = 182,17) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Logo após, 100 µL da emulsão do produto-teste foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL do produto sintético e, no caso do sorbitol, uma concentração final de 0,8 M em cada cavidade. Por último, foram adicionados 10 µL das suspensões fúngicas nas cavidades, em que cada coluna da placa se referia especificamente a uma cepa fúngica.

Foram realizados paralelamente: controle de microrganismo, despejando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD com sorbitol (0,8 M), 100 µL de água destilada estéril e 10 µL de cada suspensão fúngica; e o controle de esterilidade, em que foram colocados 200 µL do CSD em um orifício na ausência de inóculo. Por fim, foram realizados os mesmos procedimentos com o antifúngico padrão caspofungina. As placas foram seladas e incubadas a 35º C por até 48 horas para leitura posterior (Frost *et al.*, 1995; Zacchino, 2001).

4.8.2 Ensaio com ergosterol

A definição da CIM dos produtos contra as cepas fúngicas foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas para microdiluição contendo 96 cavidades com fundo em “U” (ALAMAR®), semelhante ao protocolo já descrito na determinação da CIM no subitem 4.6. O meio de cultura utilizado foi o CSD previamente suplementado com 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich®). Foram feitos, paralelamente: controle de viabilidade das cepas em estudo, colocando-se nas cavidades 100 µL de CSD acrescido de ergosterol na mesma concentração + 10 µL das suspensões fúngicas; e controle de esterilidade do meio de cultura, em que foram adicionados 200 µL do CSD em um orifício na ausência de quaisquer dos inóculos. Por fim, foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B como controle positivo, uma vez que notadamente interage com o ergosterol da membrana. Os experimentos foram feitos em triplicata e as placas seladas e incubadas a 35º C por até 48 horas para posterior leitura (Escalante *et al.*, 2008).

4.9 Atividade antibiofilme de 2-bromo-N-fenilacetamida

Biofilmes formados de *Candida albicans* podem conferir uma maior proteção às suas leveduras uma vez que tais estruturas são mais resistentes aos antifúngicos quando comparadas às células planctônicas (Yu *et al.*, 2022).

A avaliação da atividade do A1Br frente a biofilmes pré-formados de *C. albicans* ATCC 76645 em diferentes concentrações (CIM, CIM x 2, CIM x 4, CIM x 10) foi realizada com base nos seguintes protocolos, com algumas adaptações (Djordjevic; Wiedmann; Mclandsborough, 2002; Ferreira *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020). O inóculo fúngico foi preparado em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) + glicose (2%), e a densidade celular foi padronizada de acordo com a escala 0,5 de McFarland, usando um espectrofotômetro (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), $\lambda = 530$ nm. Em seguida, 1 mL foi adicionado em cada um dos 24 poços de placas para diluição com fundo plano, tendo sido incubadas por 48 horas a 35 °C para a formação do biofilme.

Posteriormente, os sobrenadantes dos poços (células planctônicas) foram aspirados, descartados e os poços lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, 1 mL de cada concentração de A1Br e 1 mL de anfotericina B (controle positivo), nas mesmas proporções (CIM, CIM x 2, CIM x 4, CIM x 10), ambos previamente solubilizados em DMSO (3%) e diluídos em CSD, foram adicionados aos poços e as placas foram reincubadas nas mesmas condições. Após esse período de reincubação os sobrenadantes dos poços foram aspirados e descartados, as placas foram lavadas mais duas vezes com PBS, secas à temperatura ambiente (45 min) e coradas (incubação de 45 min) com 1 mL de solução de Cristal Violeta 0,4% por poço. Em seguida, os poços foram lavados com água destilada estéril e imediatamente decorados (incubação de 30 min) com 1 mL de etanol 95% por poço. Por fim, os valores de absorbância para cada poço foram lidos ($\lambda = 595$ nm) usando um leitor de microplacas (GloMax-Multi, PROMEGA, Madison, WI, EUA).

A inibição da aderência foi medida de maneira indireta, uma vez que o controle de crescimento do microrganismo foi estabelecido como uma aderência fúngica de 100%. Um controle de esterilidade (apenas CSD) foi realizado, e o ensaio foi conduzido em sextuplicata.

4.10 Análises estatísticas

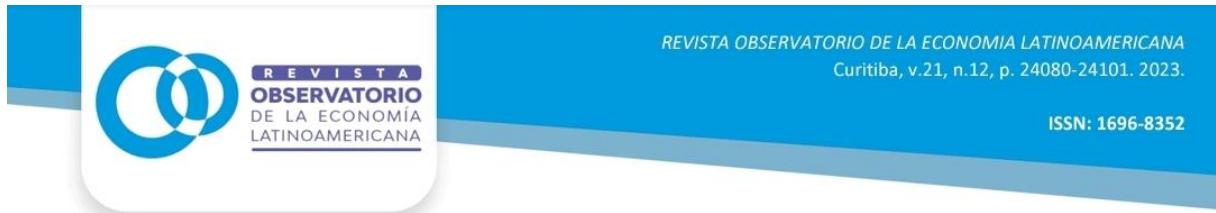
A análise dos dados foi realizada de acordo com o estabelecido na literatura referenciada em cada um dos métodos, ou seja, os resultados foram expressos como a média aritmética das respectivas triplicatas. Para a avaliação da atividade antibiofilme de 2-bromo-*N*-fenilacetamida frente a *Candida albicans* os resultados da sextuplicata foram apresentados como a média \pm desvios-padrão, tendo sido analisados por ANOVA One-Way com teste de Tukey ($P < 0,0001$) (GraphPad Prism, version 5.0 for Windows, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fungicidal and antibiofilm activities of 2-Bromo-N-Phenylacetamide Against Fluconazole-Resistant *Candida* spp.: a promising antifungal agent

<https://doi.org/10.55905/oelv21n12-035>

Artigo publicado em 07 de dezembro de 2023 na revista *Observatorio de La Economía Latinoamericana* (ISSN 1696-8352), revisada por pares. Qualis Capes na área de Farmácia: A4 (quadriênio 2017-2020).



REVISTA OBSERVATORIO DE LA ECONOMIA LATINOAMERICANA
Curitiba, v.21, n.12, p. 24080-24101. 2023.

ISSN: 1696-8352

**Fungicidal and antibiofilm activities of 2-Bromo-*N*-Phenylacetamide
Against Fluconazole-Resistant *Candida* spp.: a promising antifungal
agent**

**Atividades antibiofilme e fungicida de 2-Bromo-*N*-Fenilacetamida
Frente a *Candida* spp. Fluconazol-resistentes: um promissor agente
antifúngico**

DOI: 10.55905/oelv21n12-035

Recebimento dos originais: 01/11/2023
Aceitação para publicação: 01/12/2023

Bráulio de Almeida Teixeira

Master in Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da
Universidade Federal da Paraíba (PPGPNSB - UFPB)

Address: Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa - PB, CEP: 58051-900
E-mail: braulioteixeiramobile@gmail.com

Helivaldo Diógenes da Silva Souza

Doctor of Chemistry

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: Campus I Lot. Cidade Universitaria - PB, CEP: 58051-900
E-mail: helivaldog3@gmail.com

Gabriela Fehn Fiss

Doctor of Chemistry

Institution: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Address: Av. Roraima nº 1000 Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria - RS,
CEP: 97105-900
E-mail: gffiss@gmail.com

Petrônio Filgueiras de Athayde Filho

Doctor of Chemistry

Institution: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife - PE,
CEP: 50670-901
E-mail: athayde-filho@quimica.ufpb.br

Paula Lima Nogueira

Master in Dental Sciences

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: Campus I Lot. Cidade Universitaria - PB, CEP: 58051-900

E-mail: paulalimanog@gmail.com

Danielle da Nóbrega Alves

Doctor in Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: Campus I Lot. Cidade Universitaria - PB, CEP: 58051-900

E-mail: dnobregaalves@msn.com

Ricardo Dias de Castro

Doctor in Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: Campus I Lot. Cidade Universitaria - PB, CEP: 58051-900

E-mail: rcastro@ccs.ufpb.br

Francisco Patrício de Andrade Júnior

Master in Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: Campus I Lot. Cidade Universitaria - PB, CEP: 58051-900

E-mail: juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

Brenda Kércya da Silva Farias

Master in Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: Campus I Lot. Cidade Universitaria - PB, CEP: 58051-900

E-mail: brendakf17@gmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima

PhD in Pharmaceutical Sciences by Universidade de São Paulo (USP)

Institution: Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PPgPNSB - UFPB)

Address: Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa - PB, CEP: 58051-900

E-mail: edelolima@yahoo.com.br

ABSTRACT

Purpose: Amides are proven to possess antimicrobial properties against both fungi and bacteria. The synthetic amide 2-bromo-N-phenylacetamide exhibits antifungal activity according to scientific literature, however, data remains scarce. Given the clinical and epidemiological importance as well as the increasing antifungal resistance in *Candida* spp., here we aimed to better explore the antifungal potential of 2-bromo-N-phenylacetamide against fluconazole-resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and for the first time, against *Candida tropicalis* as well. Methods:

Minimum Inhibitory and Minimum Fungicidal Concentrations (MIC/MFC) were established by a Broth Microdilution Technique. Mode of action was explored by Ergosterol and Sorbitol assays. For investigating the combined effect between 2-bromo-*N*-phenylacetamide and the standard antifungals Amphotericin B and Fluconazole a Checkerboard Technique was performed. Finally, the antibiofilm properties of 2-bromo-*N*-phenylacetamide were assessed by a Crystal Violet Staining Assay. Results: 2-bromo-*N*-phenylacetamide exhibited a fungicidal effect, MIC of $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (87.5% of the strains) and MFC of $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (81.25% of the strains). It also demonstrated an activity against *Candida albicans* mature biofilms as effective as that for Amphotericin B at all tested concentrations. When associated with Fluconazole and Amphotericin B it exerted indifferent effects. Mode of action remained unclear. Conclusion: The synthetic amide 2-bromo-*N*-phenylacetamide possesses a strong antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* and an antibiofilm property against *Candida albicans* as effective as that exhibited for Amphotericin B.

Keywords: 2-bromo-*N*-phenylacetamide, antifungal, *Candida* spp., *Candida tropicalis*, amides.

RESUMO

Propósito: Amidas têm comprovadamente propriedades antimicrobianas contra fungos e bactérias. De acordo com a literatura científica, a amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida possui atividade antifúngica, entretanto, os dados ainda são escassos. Devido à importância clínica e epidemiológica bem como à resistência crescente aos antifúngicos por parte de *Candida* spp., o presente trabalho buscou melhor investigar o potencial antifúngico de 2-bromo-*N*-fenilacetamida frente a linhagens fluconazol-resistentes de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e, pela primeira vez, de *Candida tropicalis*. Métodos: As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) foram determinadas usando a técnica de microdiluição em caldo. O mecanismo de ação foi explorado através dos ensaios de ergosterol e de sorbitol. A fim de se investigar os efeitos combinados de 2-bromo-*N*-fenilacetamida com os antifúngicos-padrão Anfotericina B e Fluconazol foi realizado o ensaio Checkerboard. Adicionalmente, as propriedades antibiofilme de 2-bromo-*N*-fenilacetamida foram avaliadas por meio do ensaio de Cristal Violeta. Resultados: 2-bromo-*N*-fenilacetamida exibiu efeito fungicida, com uma CIM de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (87,5% das cepas testadas) e CFM de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (81,25%). Além disso, mostrou eficácia contra biofilmes maduros de *Candida albicans* semelhante à Anfotericina B em todas as concentrações testadas. Quando associado ao Fluconazol e à Anfotericina B apresentou efeitos indiferentes. O mecanismo de ação permanece passível de esclarecimento. Conclusão: A amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida demonstra forte atividade antifúngica frente a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* e exibe propriedades antibiofilme contra *Candida albicans* similares às propriedades da Anfotericina B.



Palavras-chave: 2-bromo-*N*-fenilacetamida, antifúngicos, *Candida* spp., *Candida tropicalis*, amidas.

1 INTRODUCTION

Candida spp. are the main cause of human mycoses: *Candida albicans*, often related to opportunistic infections; *Candida glabrata*, a well-known antifungal-resistant yeast; and emerging microorganisms such as *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* complex are part of this genus (LOPES; LIONAKIS, 2022). *Candida* spp. are also commonly reported as etiologic agents of systemic infections, candidemia, oral candidiasis, vulvovaginitis and cutaneous mycoses (SANTOS et al., 2018; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Based on epidemiologic studies there is a wide occurrence of mycoses in many anatomical sites due to *Candida* spp.: from bloodstream infections in Middle East and North Africa – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* complex – (GHAZI et al., 2019) towards keratitis in North America – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex – (QIAO et al., 2020), oral candidiasis in Europe – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* – (CERNÁKOVÁ et al., 2022) and in Latin America – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* complex – (SÁNCHEZ-MOLINA et al., 2023), onychomycosis and vulvovaginal candidiasis in Brazil both caused by *C. albicans* and *C. tropicalis* (MARANHÃO et al., 2019).

The antifungal drugs for treatment of *Candida* spp. infections usually include azoles and echinocandins. However, there is an increasing resistance to such drugs among *Candida* species (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Also, since the limited armamentarium of antifungal drugs, i.e., only three main classes (including polyenes), there is an urge to better understand the mechanisms of antifungal resistance and find novel therapeutic strategies against *Candida* spp. infections (LEE et al., 2021).

Researches on natural and synthetic compounds are the current basis for new antimicrobial molecules (DEMCHENKO et al., 2021) and amides are proven to exhibit antibiotic properties against fungal and bacterial strains (YADAV et al., 2018; PEREZ-CASTILLO et al., 2021). 2-bromo-*N*-phenylacetamide (C_8H_8BrNO), hereinafter referred



to as “A1Br”, is a synthetic molecule resulting from an acetylation reaction between bromoacetyl bromide and aniline which is regularly used as intermediary for chemical synthesis (SOUZA et al., 2021). It demonstrates antimicrobial activity against *Cryptococcus neoflormans* (MELO et al., 2020); *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* complex (SOUZA et al., 2021).

Proven the antimicrobial activity of A1Br and the need of researches to better explore its antifungal activity towards *Candida* spp., this work aimed to extensively evaluate the antifungal properties of A1Br against such microorganisms, isolated from different human body sites. Thus, for product testing broth microdilution method was performed to establish the Minimum Inhibitory and Minimum Fungicidal Concentrations (MIC/MFC), as well as mode of action studies, drug combination assays and biofilm inhibition assessment.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 TEST COMPOUND AND REFERENCE ANTIFUNGALS

A1Br was provided by Laboratory of Research in Bioenergy and Organic Synthesis (LPBS) from Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, which synthesis protocol followed the procedures mentioned before (SOUZA et al., 2021). Fluconazole, caspofungin and amphotericin B were used as controls and acquired from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). The test compound and the antifungal drugs used as controls were properly solubilized with dimethyl-sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil), at 5%, Tween 80 (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) at 2% and quantum suffit sterilized distilled water to obtain emulsions in the required concentrations for the experiments (CLELAND; SQUIRES, 1991; PEREIRA et al., 2015).

2.2 CULTURE MEDIA

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was used for strain maintenance while Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was used for mode of action and antibiofilm activity experiments. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 broth (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP,



Brazil) was utilized for MIC, MFC and drug combination assays. Sorbitol and ergosterol were purchased from VETEC Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil), respectively. All culture media were prepared in accordance with the instructions of the manufacturer.

2.3 STRAINS

The antifungal activity of A1Br was tested against yeast strains of reference from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Candida albicans* (CA) ATCC 76645, *Candida tropicalis* (CT) ATCC 750, *Candida glabrata* (CG) ATCC 90030 and *Candida parapsilosis* (CP) ATCC 22019. The antifungal properties were also tested against clinical strains from Antibacterial and Antifungal Activity Research Laboratory (LM), Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil: CA LM-20, CA LM-32, CA LM-35, CA LM-44, CA LM-200; CT LM-17, CT LM-135, CT LM-165; CG LM-46, CG LM-218; CP LM-439 and CP LM-689. The body sites and susceptibility profile of the strains to fluconazole and amphotericin B are presented in Table 1 and are based on Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (CLSI, 2020). Since there are not any breakpoints for amphotericin B against *Candida* spp. established by CLSI (CLSI, 2022), The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoint tables were adopted as standard (EUCAST, 2020).

Table 1. Susceptibility profile of the tested strains.

Strain	Body Site	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
		FLC*	AmB**
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	-	256 (R)	1 (S)
<i>C. albicans</i> LM-20	Lungs	128 (R)	2 (R)
<i>C. albicans</i> LM-32	Lungs	128 (R)	2 (R)
<i>C. albicans</i> LM-35	Nails	128 (R)	2 (R)
<i>C. albicans</i> LM-44	Urine	256 (R)	1 (S)
<i>C. albicans</i> LM-200	Nails	128 (R)	1 (S)
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	-	128 (R)	1 (S)
<i>C. tropicalis</i> LM-17	Oral Cavity	256 (R)	1 (S)
<i>C. tropicalis</i> LM-135	Nails	256 (R)	0.5 (S)
<i>C. tropicalis</i> LM-165	Lungs	256 (R)	0.5 (S)

<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	-	64 (R)	0.5 (S)
<i>C. glabrata</i> LM-46	Oral Cavity	128 (R)	1 (S)
<i>C. glabrata</i> LM-218	Vagina	256 (R)	1 (S)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	512 (R)	1 (S)
<i>C. parapsilosis</i> LM-439	Oral Cavity	512 (R)	0.5 (S)
<i>C. parapsilosis</i> LM-689	Bloodstream	512 (R)	2 (R)

MIC = Minimum Inhibitory Concentration; FLC = Fluconazole; AmB = Amphotericin B; S = Susceptible; R = Resistant (*CLSI, 2020; **EUCAST, 2020).

Source: Author's elaboration, 2023.

2.4 MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) AND MINIMUM FUNGICIDAL CONCENTRATION (MFC) DETERMINATIONS

The strains used for the experiments were stored in SDA at 4 °C. For performing the assays yeast suspensions were prepared in 0.9% saline solution from fresh cultures and cell density standardized using McFarland 0.5 scale (CLELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2008).

The products were established as antifungal compounds when inhibited at least 50% of the tested strains for each assay (CLELAND; SQUIRES, 1991; HAFIDH et al., 2011). MIC of A1Br was determined by broth microdilution technique in 96-well round-bottom plates (ELOFF, 1998; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2008). Initially 100 µL of double-strength RPMI-1640 broth was added to the wells. Then, 100 µL of the A1Br emulsion at an initial concentration of 1024 µg/mL were deposited on the first line of the plate and two-fold dilutions were performed obtaining different concentrations ranging from 1024 to 4 µg/mL. Finally, 10 µL of yeast inocula was added to the wells respectively, i.e., one per column. Simultaneously, wells containing only culture media (sterility), culture media + inocula (viability), culture media + inocula + solvents (vehicle interference); and standard antifungals were used as controls.

MIC determination was performed in triplicate and plates were incubated at 35 ±2 °C during 24-48 h for further evaluation. MIC was defined as the lowest concentration of a product which inhibits visible fungal growth compared to controls and the compounds were considered with strong activity (MIC ≤ 600 µg/mL), moderate activity (600 < MIC ≤ 1500 µg/mL) and weak activity or inactivity (MIC > 1500 µg/mL) (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON, 2007).



For determination of MFC 10 μ L of supernatant from wells presenting no visible growth (MIC, MIC \times 2, MIC \times 4) were transferred to new 96-well plates containing only RPMI broth and incubated under the same conditions described previously. MFC was determined as the lowest concentration of a compound which completely inhibits fungal growth. The assay was conducted in triplicate and all controls performed. Ultimately, MFC/MIC ratio was calculated for determining the antifungal effect: fungicidal if $1 \leq \text{MFC/MIC} \leq 2$ or fungistatic when $\text{MFC/MIC} > 2$ (SALIE; EAGLES; LENG, 1996; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

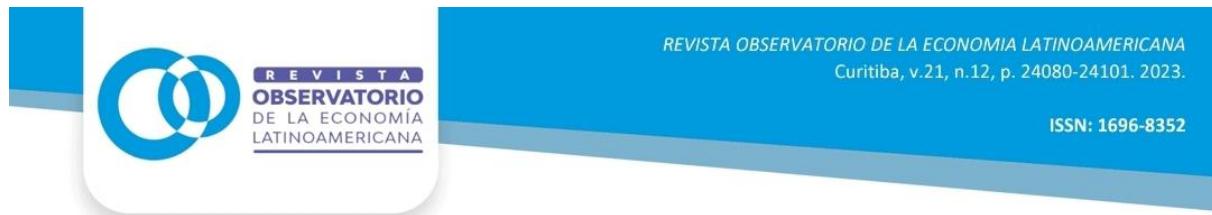
2.5 ERGOSTEROL ASSAY

Amphotericin B has been successfully used in the treatment of invasive candidiasis since 1959 when it was adopted into antifungal therapy (BARANTSEVICH N; BARANTSEVICH E, 2022). One year before, it had been discovered that addition of ergosterol could inhibit the effect of amphotericin B on fungal species (CAROLUS et al., 2020). Therefore, it was discussed whether A1Br could act on fungal membrane.

For this purpose, a determination of A1Br's MIC against *Candida* spp. strains was performed by microdilution technique as previously described, using SDB supplemented with ergosterol (400 μ g/mL). Amphotericin B was used as a positive control due to its established activity against fungal membranes (CAVASSIN et al., 2021).

2.6 SORBITOL ASSAY

Sorbitol is an osmotic stabilizer which is pivotal for fungal growth when such microorganisms are in the presence of drugs that act on the cell wall (BIERNASIUK et al., 2021). To investigate whether A1Br could exert its antifungal effect on cell wall, a MIC by microdilution method was performed using SDB prepared with sorbitol at a final concentration of 0.8 M, following the same procedures described for MIC determination. A control using caspofungin, a drug that act on fungal wall, as well as controls for medium sterility and strains viability were carried out (FROST et al., 1995; ZACCHINO, 2001).



2.7 DRUG COMBINATION TEST

For evaluating the effect of A1Br in association with reference antifungals against *Candida* spp. strains the checkerboard technique was carried out (SOUZA et al., 2021). It consisted on the combination of different concentrations of A1Br (MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC, MIC/2, MIC/4, MIC/8) with those of each standard antifungal (fluconazole and amphotericin B).

The procedure was as follows: 100 μ L of RPMI were added to wells of a 96-well round-bottom microplate. In a parallel manner, dilutions of A1Br, fluconazole and amphotericin B were prepared in order to obtain the concentrations MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC, MIC/2, MIC/4, MIC/8. 50 μ L of A1Br (one concentration per column) were added to 50 μ L of amphotericin B or fluconazole (one concentration per row), forming a range of different concentrations in combination (checkerboard). Finally, 20 μ L of the inoculum were added in the wells. The test was performed in triplicate and microplates were incubated during 24-48h at 35 \pm 2 °C for further analysis.

The combined effects of A1Br and reference antifungals were established by the fractional inhibitory concentration index (FICI), which is calculated by the sum of fractional inhibitory concentrations (FIC) of each product: FICI = FICa + FICb. The FIC for each product is calculated by the ratio: combined MIC/isolated MIC. The association was defined as synergistic for FICI \leq 0.5; indifferent for 0.5 < FICI \leq 4; and antagonistic for FICI > 4 (ODDS, 2003; SHIN, 2003).

2.8 ANTIBIOFILM ACTIVITY ASSAY

Candida albicans formed biofilms can protect the yeasts living within it once they are more resistant to antifungal agents (including fluconazole and amphotericin B) than planktonic cells (YU et al., 2022).

The evaluation of A1Br activity against preformed biofilms of *C. albicans* ATCC 76645 at different concentrations (MIC, MIC x 2, MIC x 4, MIC x 10) was carried out based on adapted protocols (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDSBOROUGH, 2002; FERREIRA et al., 2017; ALVES et al., 2020). The fungal inoculum was prepared within Sabouraud Dextrose Broth (SDB) plus glucose (2%) and its cell density

standardized according to McFarland 0.5 scale using a spectrophotometer (Kasvi, Curitiba, PR, Brazil), $\lambda = 530$ nm. Then, 1 mL was added to the wells of 24-well flat bottom plates and incubated during 48 h at 35 °C for biofilm mass formation.

Thereafter, the supernatants of the wells (planktonic cells) were aspirated and discarded and the wells washed twice using Phosphate-Buffered Saline (PBS). Subsequently, 1mL of each concentration of A1Br and 1 mL of amphotericin B (positive control) at the same proportions (MIC, MIC x 2, MIC x 4, MIC x 10), both previously solubilized with DMSO (3%) and diluted in SDB, were added to the wells and the plates reincubated under the same conditions. Following this reincubation period, the supernatants of the wells were aspirated and discarded, the plates washed twice with PBS again, dried at room temperature (45 min) and stained (45 min incubation) using 1 mL of 0.4% Crystal Violet (w/v) per well. Then, the wells were washed with sterile distilled water and immediately de-stained (30 min incubation) using 1 mL of 95% ethanol per well. Finally, absorbance values for each well were read ($\lambda = 595$ nm) using a microplate reader (Glo-Max-Multi, PROMEGA, Madison, WI, USA).

The inhibition of adherence was indirectly measured once a value of 100% fungal adherence (yeast growth control) was established. A sterility control (SDB only) was performed and the assay conducted in sextuplicate. Data were analysed by One-Way ANOVA with Tukey post-test ($P < 0.0001$) (GraphPad Prism, version 5.0 for Windows, San Diego, CA, EUA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) AND MINIMUM FUNGICIDAL CONCENTRATION (MFC) OF A1BR

Table 2. MIC and MFC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of A1Br against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* strains.

Strain	A1Br			So	S	V
	MIC	MFC	MFC/MIC			
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. albicans</i> LM-20	64	64	1 (Fungicidal)	+	-	+

<i>C. albicans</i> LM-32	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. albicans</i> LM-35	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. albicans</i> LM-44	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. albicans</i> LM-200	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. tropicalis</i> LM-17	32	32	1 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. tropicalis</i> LM-135	32	32	1 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. tropicalis</i> LM-165	32	32	1 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. glabrata</i> LM-46	64	64	1 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. glabrata</i> LM-218	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-439	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+
<i>C. parapsilosis</i> LM-689	32	64	2 (Fungicidal)	+	-	+

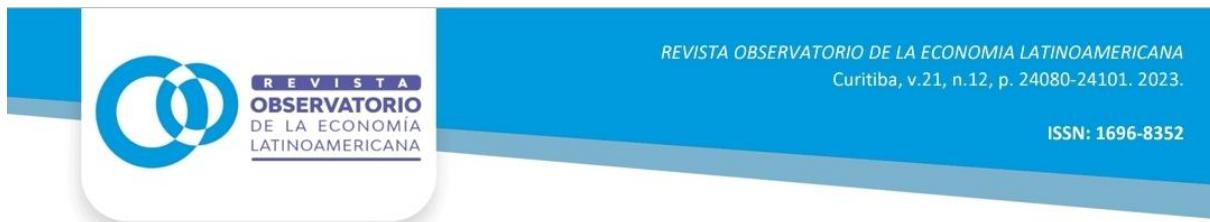
MIC = Minimum Inhibitory Concentration; MFC = Minimum Fungicidal Concentration; A1Br = 2-bromo-*N*-phenylacetamide; So = Solvent control; S = Sterility control; V = Viability control; + = Microbial growth; - = Absence of microbial growth.

Source: Author's elaboration, 2023.

Amides are widely distributed and possess crucial importance for the material and biological properties of both natural and synthetic compounds (MEDEIROS et al., 2020) and its derivatives have been explored over the last decades due to their fungicidal and fungistatic potential (TSIKOLIA et al., 2019).

The synthetic amide 2-bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br) exhibited MIC of 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 87.5% of the strains enrolled in this work, while for 12.5% of the strains, the MIC was 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Regarding the MFC, it was 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 81.25% of the strains and for the other 18.75% it was 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The ratio $1 \leq \text{MFC/MIC} \leq 2$ reveals this molecule as fungicidal in 100% of the strains studied.

These findings corroborate other results previously found in the literature: antifungal activity of A1Br against *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex strains, isolated from patients with invasive candidiasis, obtained MIC ranging from 4 to 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with fungicidal profile (SOUZA et al., 2021). The present study is the first to explore the antifungal activity of A1Br against *Candida tropicalis* strains and revealed a MIC of 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for both the standard strain and the clinical isolates, with a fungicidal effect.



Other studies have highlighted the antifungal role of synthetic amides: A1Br against *Cryptococcus neoformans* (MELO et al., 2020); A1Cl (2-chloro-*N*-Phenylacetamide) against *Aspergillus flavus* (FERREIRA et al., 2021), *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* complex and *Candida tropicalis* (SILVA et al., 2022; DINIZ-NETO et al., 2024).

Despite low Minimum Inhibitory Concentrations of amphotericin B for treating *Candida* spp. infections, MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ≤ 1 (EUCAST, 2020), its administration is associated with renal or infusion-related toxicity in 80% of patients. Such toxicity is due to the interaction of this antifungal with cholesterol present in human cell membranes and its most frequent side effects are hypokalemia, hypomagnesemia, azotemia, anaphylaxis, fever and anemia due to low concentrations of erythropoietin. The use of conventional amphotericin B can lead to renal failure (reversible with discontinuation of use) and need for dialysis (NOOR; PREUSS, 2023).

A1Br exhibited a MIC of $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ against the *Candida* spp strains tested in this study, however, it possesses good oral bioavailability and low risk of irritating effects in *in silico* analysis (MELO et al., 2020). Further studies about A1Br toxicity and pharmacokinetics may be performed in order to confirm its safety and oral bioavailability for human use.

3.2 MODE OF ACTION OF A1Br: ERGOSTEROL AND SORBITOL ASSAYS

Table 3. MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of A1Br and Amphotericin B against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* strains in the absence and presence of ergosterol $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Strain	A1Br		Amphotericin B	
	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	32	32	1	16
<i>C. albicans</i> LM-20	64	64	2	32
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	32	32	1	16
<i>C. tropicalis</i> LM-17	32	32	1	32
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	32	32	0.5	16
<i>C. glabrata</i> LM-46	64	64	1	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	32	32	1	32
<i>C. parapsilosis</i> LM-439	32	32	0.5	16

A1Br = 2-bromo-*N*-phenylacetamide. Source: Author's elaboration, 2023.

Table 4. MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of A1Br and Caspofungin against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* strains in the absence and presence of sorbitol 0.8 M.

Strain	A1Br		Caspofungin	
	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	32	32	0.125	0.5
<i>C. albicans</i> LM-20	64	64	0.125	1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	32	32	0.125	1
<i>C. tropicalis</i> LM-17	32	32	0.25	1
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	32	32	0.062	0.25
<i>C. glabrata</i> LM-46	64	64	0.062	0.5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	32	32	0.062	0.5
<i>C. parapsilosis</i> LM-439	32	32	0.125	0.5

A1Br = 2-bromo-*N*-phenylacetamide.

Source: Author's elaboration, 2023.

In order to predict the mode of action of A1Br, ergosterol and sorbitol assays were carried out as previously described. Based on *in silico* analysis A1Br presented interactions with the cell wall enzyme exo- β -(1,3)-glucanase (binding energy: -57.45kJ.mol^{-1}) and with cell membrane enzyme 14- α -demethylase (binding energy: -64.07kJ.mol^{-1}) from *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex (SOUSA et al., 2021). Otherwise, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of A1Br against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*,



Candida glabrata and *Candida parapsilosis* in the present study remained the same in the absence and presence of ergosterol and sorbitol.

The antifungal effect of a tested lignin against *C. albicans* exhibited relations to PKC pathway-related and Cek1 pathway-related genes (XIE et al., 2022). Similarly, another study has highlighted the relation between glucose metabolism pathways and the antifungal activity of some compounds against *C. albicans* (CHEN et al., 2020). However, data about *Candida* spp.-related pathways in antifungal compounds are yet scarce.

3.3 INDIFFERENT EFFECTS OF A1BR COMBINED WITH AMPHOTERICIN B OR FLUCONAZOLE

Table 5. Associations A1Br + Amphotericin B and A1Br + Fluconazole against *Candida* spp.

Strain	FIC A1Br	FIC AmB	FICI A1Br + AmB	FIC A1Br	FIC FLC	FICI A1Br + FLC
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	1	1	2 (I)	2	0.125	2.125 (I)
<i>C. albicans</i> LM-20	1	1	2 (I)	1	1	2 (I)
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1	0.125	1.125 (I)	1	1	2 (I)
<i>C. tropicalis</i> LM-17	1	0.125	1.125 (I)	1	1	2 (I)
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	1	0.125	1.125 (I)	1	1	2 (I)
<i>C. glabrata</i> LM-46	1	0.125	1.125 (I)	1	0.125	1.125 (I)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	1	2 (I)	1	0.125	1.125 (I)
<i>C. parapsilosis</i> LM-439	0.5	0.125	0.625 (I)	1	0.125	1.125 (I)

FICI = Fractional Inhibitory Concentration Index; FIC = Fractional Inhibitory Concentration; A1Br = 2-bromo-*N*-phenylacetamide; AmB = Amphotericin B; FLC = Fluconazole; I = Indifferent.

Source: Author's elaboration, 2023.

For evaluating the combined effect of A1Br + Amphotericin B and A1Br + Fluconazole a checkerboard technique was performed in accordance to the previously described. None of the associations presented any synergism at concentrations MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC, MIC/2, MIC/4 and MIC/8 against the tested strains. Similar results were noted, which also presented any synergism in the association A1Br + Fluconazole at the same proportions MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC, MIC/2, MIC/4 and MIC/8 against *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex (SOUSA et al., 2021). Once there



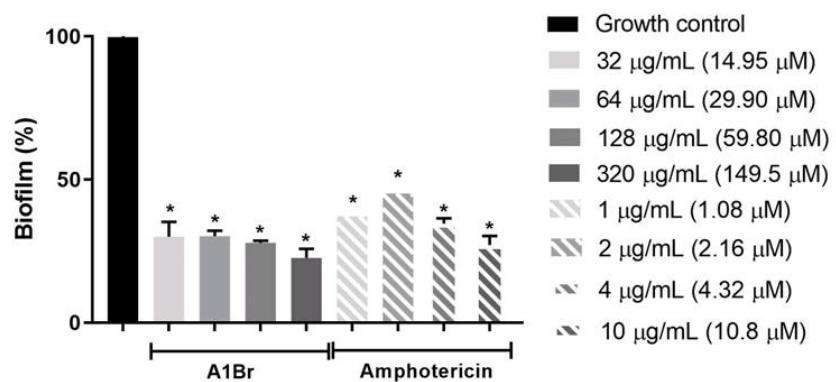
are scarce data about combinations between A1Br and standard antifungals in literature, such associations should be considered for additional analysis.

3.4 DISRUPTION OF *CANDIDA ALBICANS* PREFORMED BIOFILMS DUE TO A1BR ACTIVITY

Morphology, metabolic characteristics and species interfere in *Candida* spp. biofilm formation (MUNUSAMY; VADIVELU; TAY, 2018). Biofilms of *C. albicans* have a most diversified structure: blastopores and hyphae within an extracellular matrix of polysaccharides, contrasting to *C. glabrata*, which are formed by yeast-like cells only within a multilayer arrangement and *C. parapsilosis*, an agglomeration of yeasts attached to a surface with a minimum of extracellular matrix. Concerning *C. tropicalis* biofilm, it is an arrangement of yeasts, pseudohyphae and a high hyphal budding (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Despite the up-regulation of genes for filamentation in many *Candida* spp., *Candida albicans* co-expresses filamentation and virulence-related genes, differing from other *Candida* spp., whose genes related to some virulence factors are down-regulated. It could explain some reasons for high rates of *C. albicans* infections (nearly 50%) in comparison to other *Candida* spp (KADOSH; MUNDODI, 2020).

For exploring the antibiofilm potential of A1Br against *C. albicans*, a Crystal Violet-based assay was performed as stated before. Results are presented below (Figure 1).

Figure 1. Inhibitory effect of 2-bromo-N-Phenylacetamide and Amphotericin B against *Candida albicans* biofilm. Results presented as mean \pm SD of three independent experiments. (One-way ANOVA with Tukey post-test, ***p<0.0001).



Source: Author's elaboration, 2023.

A1Br exhibited a biofilm reduction ranging from 59% to 80% at the tested concentrations $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CIM) and $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CIM x 10), respectively. In turn, Amphotericin B presented a biofilm reduction ranging from 32% to 83% at the tested concentrations $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CIM) and $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CIM x 10), respectively. A significant statistical difference was found when comparing the control group (growth control) to all tested groups ($P < 0.0001$). There were no statistically significant differences between the tested Minimum Inhibitory Concentrations (** $P < 0.0043$) of A1Br and Amphotericin B as well as between the tested Suprainhibitory Concentrations CIM x 2 (**** $P < 0.0001$), CIM x 4 ($P = 0.9994$) and CIM x 10 ($P = 0.1033$).

4 CONCLUSION

2-bromo-N-phenylacetamide, A1Br, presented a strong antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* complex, with Minimum Inhibitory Concentrations of $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 87.5 % of the sixteen tested strains. The Minimum Fungicidal Concentration was $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 81.25 % of the same strains and



the molecule was classified as a fungicide. It was the first time the antifungal activity of A1Br was explored against *Candida tropicalis*, which was proven to be strong as well, once a MIC of $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and a MFC of $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (75 % of the *C. tropicalis* strains) were found. It is worth mentioning that at MIC, MIC x 2, MIC x 4 and MIC x 10, A1Br exhibited a statistically significant activity against *Candida albicans* preformed biofilms as effective as that found for Amphotericin B at the same concentrations. Since the mode of action of A1Br antifungal activity towards *Candida* spp. remains unclear and its toxicity and good oral bioavailability were predominantly evaluated through *in silico* analysis, further studies using different tools are required for confirming its safe and effective use in human health.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). The authors wish to express their thanks to Federal University of Paraíba (UFPB) and funding agencies support.

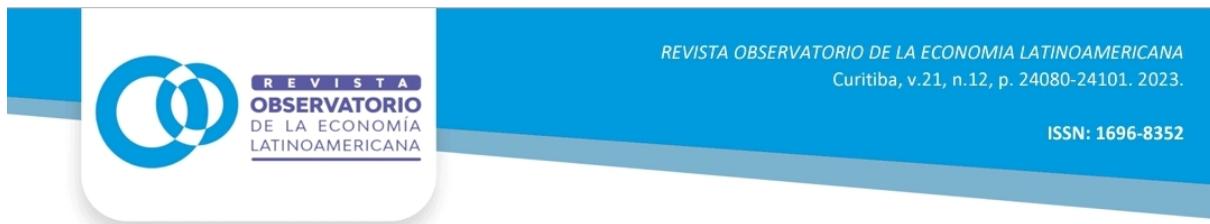
DISCLOSURE OF INTEREST

All the authors consented the publication and declared no competing interest.



REFERENCES

- ALVES, D. N. et al. Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. **Molecules**, v. 25, p. 5969, 2020. doi: 10.3390/molecules25245969
- AST News *Candida auris* Update: Method Variability with Amphotericin B Susceptibility Testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, <https://clsit.org/about/blog/ast-news-update-june-2022-hot-topic/#:~:text=Firstly%20there%20are%20no%20CLSI,scientific%20data%20to%20support%20it>. Accessed 15 Jun 2023.
- BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and treatment of invasive candidiasis. **Antibiotics**, v. 11, p. 718, 2022. doi: 10.3390/antibiotics11060718
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, p. 312, 2020. doi: 10.3390/antibiotics9060312
- BIERNASIUK, A. et al. The newly synthesized thiazole derivatives as potential antifungal compounds against *Candida albicans*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, p. 6355-67, 2021. doi: 10.1007/s00253-021-11477-7
- CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and other polyenes – discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **J Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020. doi: 10.3390/jof6040321
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Front Med**, v. 5, p. 28, 2018. doi: 10.3389/fmed.2018.00028
- CAVASSIN, F. B. et al. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infect Dis Ther**, v. 10, p. 115-147, 2021. doi: 10.1007/s40121-020-00382-7
- CERNÁKOVÁ, L. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* spp. isolates from a hospital in Slovakia. **Medicina**, v. 58, p. 576, 2022. doi: 10.3390/medicina58050576
- CHEN, X. et al. Potential antifungal targets based on glucose metabolism pathways of *Candida albicans*. **Front Microbiol**, v. 11, p. 296, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.00296
- CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: Lorain VMD, editor. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, 1991, p. 739-788.



CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2020; Suppl M60-Ed2.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2008; Suppl S (3).

DEMCHENKO, S. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of new 3-Aryl-5H-pyrrolo[1,2-a]imidazole and 5H-Imidazo[1,2-a]azepine quaternary salts. **Molecules**, v. 26, p. 4253. doi: 10.3390/molecules26144253

DINIZ-NETO, H. et al. Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp. **Braz J Biol**, v. 84, 2024. doi: 10.1590/1519-6984.255080

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 6, p. 2950-8, 2002.

ELOFF JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, p. 711-3, 1998.

EUCAST. Antifungal Clinical Breakpoint Table. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2020; Version 10.0.

FERREIRA, E. S. et al. Antifungal activity and mechanism of action of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with activity against strains of *Aspergillus flavus*. **An Acad Bras Cienc**, v. 93, n. 3, 2021. doi: 10.1590/0001-3765202120200997

FERREIRA, G. L. S. et al. Antibiofilm activity and mechanism of action of the disinfectant chloramine T on *Candida* spp., and its toxicity against human cells. **Molecules**, v. 22, p. 1527, 2017. doi: 10.3390/molecules22091527

FROST, D. J. et al. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **J Antibiot**, v. 48, n. 4, p. 306-10, 1995.

GHAZI, S. et al. The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. **J Mycol Med**, v. 29, p. 245-52, 2019. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.07.006

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem Anal**, v. 11, n. 3, p. 137-47, 2000.

HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J**, v. 5, p. 96-106, 2011.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-31, 2002.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **J Etnopharm**, v. 110, p. 391-400, 2007.

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **J Fungi**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020. doi: 10.3390/jof6010013

LEE, Y. et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chem Rev**, v. 121, n. 6, p. 3390-411, 2021. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950

MARANHÃO, F. C. A. et al. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Braz J Microbiol**, v. 50, p. 969-78, 2019. doi: 10.1007/s42770-019-00096-0

MEDEIROS, D. et al. Isoeugenol and hybrid acetamides against *Candida albicans* isolated from the oral cavity. **Pharmaceuticals**, v. 13, p. 291, 2020. doi: 10.3390/ph13100291

MELO, T. R. et al. Antifungal and antibiofilm activity of 2-bromo-*N*-phenylcetamide against *Cryptococcus neoformans*. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 13, n. 12, p. 173-6, 2020. doi: 10.22159/ajpcr.2020.v13i12.39834

MUNUSAMY, K.; VADIVELU, J.; TAY, S. T. A study on *Candida* biofilm growth characteristics and its susceptibility to aureobasidin A. **Rev Iberoam Micol**, v. 35, n. 2, p. 68-72, 2018. doi: 10.1016/j.riam.2017.07.001

NCUBE, N.; AFOLAYAN, A.; OKOH, A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **Afr J Biotechnol**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008. doi: 10.5897/AJB07.613

NOOR, A.; PREUSS, C. V. Amphotericin B. In: StatPearls. FL: Treasure Island, 2023. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003. doi: 10.1093/jac/dkg301

PEREIRA, F. O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharm Biol**, v. 53, n. 2, p. 228-34, 2015. doi: 10.3109/13880209.2014.913299



PEREZ-CASTILLO, Y. et al. Antifungal activity of N-(4-Halobenzyl)amides against *Candida* spp. and molecular modeling studies. **Int J Mol Sci**, v. 23, p. 419, 2021. doi: 10.3390/ijms23010419

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clin Microbiol Infect**, v. 25, p. 792-8, 2019. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.028

QIAO, G. L. et al. *Candida* keratitis: epidemiology, management, and clinical outcomes. **Cornea**, v. 39, n. 7, p. 801-5, 2020.

SALIE, F.; EAGLES, P.; LENG, H. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. **J Ethnopharm**, v. 52, n. 1, p. 27-33, 1996. doi: 10.1016/0378-8741(96)01381-5

SÁNCHEZ-MOLINA, M. et al. Species diversity of the genus *Candida* in the oral cavity of cancer patients in Barranquilla, Colombia. **Rev Argent Microbiol**, v. 55, p. 12-9, 2023. [Spanish]. doi: 10.1016/j.ram.2022.05.011

SANTOS, G. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Front. Microbiol**, v. 9, p. 1351, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 35, p. 275-20, 2004.

SHIN, S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 5, p. 389-93, 2003. doi: 10.1007/BF02976696

SILVA, S. L. et al. Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide, docking and molecular dynamics studies against clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*. **J Appl Microbiol**, v. 132, p. 3601-17, 2022. doi: 10.1111/jam.15498

SOUZA, R. et al. *In silico* and *in vitro* analysis of a new potential antifungal substance, 2-bromo-N-phenylacetamide, against invasive candidiasis isolates. **Rev Colomb Cienc Quím Farm**, v. 50, n. 3, p. 695-707, 2021. doi: 10.15446/rccqifa.v50n3.100227

TSIKOLIA, M. et al. Fungicidal properties of some novel trifluoromethylphenyl amides. **Chem Biodivers**, 2019. doi: 10.1002/cbdv.201800618

XIE, Y.; HUA, H.; ZHOU, P. Magnolol as a potent antifungal agent inhibits *Candida albicans* virulence factors via the PKC and Cek1 MAPK signaling pathways. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.935322



YADAV, S. et al. Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of 2-(1-benzoyl-1*H*-benzol[*d*]imidazol-2-ylthio)-*N*-substituted acetamides. **Chem Cent J**, v. 12, p. 66, 2018. doi: 10.1186/s13065-018-0432-3

YU, J. et al. Inhibitory effect of ficin on *Candida albicans* biofilm formation and pre-formed biofilms. **BMC Oral Health**, v. 22, p. 350, 2022. doi: 10.1186/s12903-022-02384-y

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes RA, editor. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, 435-79.

6 CONCLUSÕES

Por fim, baseando-se nos achados deste estudo, pode-se concluir que a amida sintética 2-bromo-*N*-fenilacetamida:

- Possui forte atividade antifúngica, de caráter fungicida, frente a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) e *Candida parapsilosis* fluconazol-resistentes;
- Quando de sua combinação com os antifúngicos-padrão fluconazol ou anfotericina B mostrou-se indiferente;
- Seu efeito não se dá por complexação com o ergosterol da membrana celular fúngica tampouco por alteração direta da integridade da parede celular destes microrganismos, de modo que são necessárias análises adicionais a fim de elucidar qual o seu mecanismo de ação fungicida;
- Possui considerável atividade disruptiva contra biofilmes maduros de *Candida albicans*, sendo tal efeito tão significativo quanto aqueles da anfotericina B nas mesmas condições testadas, quando comparados cada tratamento com o grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ALP, S. et al. Expect the unexpected: fungemia caused by uncommon *Candida* species in a Turkish University Hospital. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 40, n. 7, p. 1539-1545, 2021.
- ANDRADE-JÚNIOR, F. P. **Perfil epidemiológico de dermatofitoses em pacientes atendidos em um laboratório privado de João Pessoa-PB, entre 2015 a 2019 e avaliação antifúngica de 2-bromo-*N*-fenilacetamida frente a isolados clínicos do gênero *Microsporum***. 2020. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.
- ARASTEHFAR, A. et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. **Med Mycol**, v. 58, n. 6, p. 766-773, 2020.
- ARCE-TORRES, L. F. et al. Metabolitos secundarios con actividad medicinal extraídos de hongos provenientes de Centroamérica. **Tecnol Marcha**, v. 33, n. 3, p. 80-89, 2020.
- AUGOSTINE, C. R.; AVERY, S. V. Discovery of Natural Products With Antifungal Potential Through Combinatorial Synergy. **Front Microbiol**, v. 13, 2022.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **J Pharm Anal**, v. 6, n. 2, p. 71–79, abr. 2016.
- BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, 2022.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infect Dis Clin North Am**, v. 35, n. 2, p. 279-311, 2021.
- BEZERRA, L. S. et al. Antifungal Efficacy of Amphotericin B in *Candida Albicans* Endocarditis Therapy: Systematic Review. **Braz J Cardiovasc Surg**, v. 35, n. 5, p. 789-796, 2020.
- BOUZ, G.; DOLEŽAL, M. Advances in Antifungal Drug Development: An Up-To-Date Mini Review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, 2021.
- BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **J Fungi**, v. 9, n. 1, 2023.
- BUTASSI, E. et al. 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.
- CALZETTA, L.; KOZIOL-WHITE, C. Pharmacological interactions: Synergism, or not synergism, that is the question. **Curr Res Pharmacol Drug Discov**, v. 2, 2021.

CAMPOY, S.; ADARIO, J. L. Antifungals. **Biochem Pharmacol**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chem Res Toxicol**, v. 33, n. 1, p. 95-118, 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antimicrobial Resistance in *Candida***. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/antifungal-resistant.html>>. Acesso em: 7 jan. 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Vulvovaginal Candidiasis (VVC)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/candidiasis.htm>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

CHEVALIER, M.; RANQUE, S.; PRÊCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. **Med Mycol**, v. 56, n. 6, p. 653-667, 2018.

CHIMENZ, R. et al. IL-17 serum level in patients with chronic mucocutaneous candidiasis disease. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 33, n. suppl 27, p. 77-79, 2022.

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

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

CORREA-ROYERO, J. et al. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

COSTE, A. T. et al. Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). Emerging echinocandin-resistant *Candida albicans* and *glabrata* in Switzerland. **Infection**, v. 48, n. 5, p. 761-766, 2020.

DAHIYA, S. et al. Antimycotic Drugs and their Mechanisms of Resistance to *Candida* Species. **Curr Drug Targets**, v. 23, n. 2, p. 116-125, 2022.

DEMCHENKO, S. et al. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of New 3-Aryl-5*H*-pyrrolo[1,2-*a*]imidazole and 5*H*-Imidazo[1,2-*a*]azepine Quaternary Salts. **Molecules**, v. 26, n. 14, 2021.

DIONGUE, K. et al. Cases of skin and nail candidiasis diagnosed at the parasitology and mycology laboratory of Le Dantec University Hospital in Dakar, 2008-2015. **Med Sante Trop**, v. 28, n. 4, p. 390-394, 2018.

- DUGGAL, R. et al. Prevalence of species-specific candidiasis and status of oral hygiene and dentition among diabetic patients: A hospital-based study. **Indian J Dent Res**, v. 32, p. 292-298, 2021.
- EGRI, N. et al. Primary immunodeficiency and chronic mucocutaneous candidiasis: pathophysiological, diagnostic, and therapeutic approaches. **Allergol Immunopathol**, v. 49, n. 1, p. 118-127, 2021.
- ELOFF, J. N. A. Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, n.8, p. 711-713, 1998.
- ESCALANTE, A. et al. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J Nat Prod**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725, 2008.
- FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix--involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 2, p. 165-169, 2015.
- FISHER, M. C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022.
- FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018.
- FLY, J. H. et al. Updates in the Pharmacologic Prophylaxis and Treatment of Invasive Candidiasis in the Pediatric and Neonatal Intensive Care Units: Updates in the Pharmacologic Prophylaxis. **Curr Treat Options Infect Dis**, v. 14, n. 2, p. 15-34, 2022.
- FRÍAS-DE-LEÓN, M. G. et al. *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, 2021.
- FROST, D. J. et al. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **J Antibiot**, v. 48, n. 4, p. 306–310, 1995.
- GAWAZ, A.; WEISEL, G. Mixed infections are a critical factor in the treatment of superficial mycoses. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 731-735, 2018.
- GHARAGHANI, M. et al. Candiduria; a review article with specific data from Iran. **Turk J Urol**, v. 44, n. 6, p. 445-452, 2018.
- GLAMPEDAKIS, E. et al. Efficacy of antifungal monotherapies and combinations against *Aspergillus calidoustus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, 2018.

GOMES, V. T. et al. Assessment of high-power LED in the adhesion of wild *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Res J Pharm Biol Chem Sci**, v. 11, n. 6, p. 75, 2020.

GÓMEZ-CASANOVA, N. et al. Inhibition of *Candida glabrata* Biofilm by Combined Effect of Dendritic Compounds and Amphotericin. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, 2022.

GÓMEZ-MOLERO, E. et al. *Candida parapsilosis* Colony Morphotype Forecasts Biofilm Formation of Clinical Isolates. **J Fungi**, v. 7, n. 1, 2021.

GONÇALVES, I.; NASCIMENTO, A.; FARIAS, D. Avaliação da embriotoxicidade da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra *Streptococcus mutans* utilizando *Danio rerio*, um vertebrado modelo. **CONBRACIS Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**, 2016.

GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL. **Comissão Permanente de Protocolos de Atenção à Saúde**. Disponível em:

<<https://www.saude.df.gov.br/documents/37101/87400/Protocolo+de+Acesso+da+Aten%C3%A7%C3%A3o+Prim%C3%A1ria+%C3%A0+Sa%C3%BAde+do+DF+%E2%80%93+APS.pdf/2a1f9b6f-46e8-b01c-f656-1f6988251656?t=1648646629690>>.

Acesso em: 12 nov. 2022.

GRELA, E. et al. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, 2019.

GRIGOR'EVA, A. et al. Changes in the Ultrastructure of *Candida albicans* Treated with Cationic Peptides. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, 2020.

GUPTA, P.; GUPTA, H.; POLURI, K. M. Geraniol eradicates *Candida glabrata* biofilm by targeting multiple cellular pathways. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, n. 13, p. 5589-5605, 2021.

GUPTA, P.; PRUTHI, V.; POLURI, K. M. Mechanistic insights into *Candida* biofilm eradication potential of eucalyptol. **J Appl Microbiol**, v. 131, n. 1, p. 105-123, 2021.

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

HAFIDH, R.R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J**, v. 5, p. 96-106. 2011.

HAMEED, S. et al. Revisiting the Vital Drivers and Mechanisms of β -Glucan Masking in Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 10, 2021.

HASSAN, Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. *Candida glabrata*: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. **J Fungi**, v. 7, n. 8, 2021.

HEARD, S. C.; WU, G.; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Curr Opin Biotechnol**, v. 69, p. 232-241, 2021.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing, an elephant. **J Etnopharmacol**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

ITO, J. I.; HOOSHMAND-RAD, R. Treatment of Candida infections with amphotericin B lipid complex. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. Suppl 6, 2005.

IVANOV, M.; ĆIRIĆ, A.; STOJKOVIĆ, D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 5, p. 2756, 2022.

JAFRI, H.; AHMAD, I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J Mycol Med**, 2019.

JEŽÍKOVÁ, Z. et al. Synergy Over Monotherapy. **Curr Microbiol**, 2019.

KATKE, S. et al. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/aryl acetamide derivatives. **Int J Pharm Sci Res**, v. 2, n. 7, p. 148-156, 2011.

KATRAGKOU, A. et al. In vitro combination therapy with isavuconazole Against *Candida* spp. **Med Mycol**, v. 55, n. 8, p. 859-868, 2017.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol**, v. 71, 2023.

KAY, A. et al. Complete clinical response to combined antifungal therapy in two cats with invasive fungal rhinosinusitis caused by cryptic *Aspergillus* species in section *Fumigati*. **Med Mycol Case Rep**, v. 34, p. 13-17, 2021.

KHODADADI, H. et al. Prevalence of superficial-cutaneous fungal infections in Shiraz, Iran: A five-year retrospective study (2015-2019). **J Clin Lab Anal**, v. 35, n. 7, 2021.

KÖHLER, J. R. et al. Fungi that infect humans. **Microbiol Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.

KRUKIEWICZ, K. et al. Recent Advances in the Control of Clinically Important Biofilms. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 17, 2022.

KUMAR, A.; JHA, A. **Anticandidal agents**. Elsevier, p. 11-39, 2017.

LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chem Rev**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2021.

LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. **Br Dent J**, v. 223, n. 9, p. 675-681, 2017.

LEWIS, R. E. et al. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LISBOA, T. M. H. **TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO TIOFÊNICO-ACRIDÍNICO**. 2020. 171 f. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 1, 2018.

MARANHÃO, F. C. A. et al. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Braz J Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 969-978, 2019.

MARTÍNEZ-HERRERA, E. et al. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* in Ibero-America. **J Fungi**, v. 8, n. 1, 2021.

MELO, T. R. **INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO 2-BROMO-N-FENILACETAMIDA**. 2021. 122 f. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.

MISHRA, A. A.; KOH, A. Y. The microbial and host factors that govern *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. **Curr Opin Microbiol**, v. 63, p. 29-35, 2021.

MOHANKUMAR, B. et al. Vaginosis: Advances in new therapeutic development and microbiome restoration. **Microb Pathog**, v. 168, 2022.

MORAES-PINTO, M. I.; FERRARINI, M. A. Opportunistic infections in pediatrics: when to suspect and how to approach. **J Pediatr**, v. 96, n. S1, p. 47-57, 2020.

MURPHY, S. E.; BICANIC, T. Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches in Invasive Candidiasis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, 2021.

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

NIVOIX, Y.; LEDOUX, M. P.; HERBRECHT, R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 41, n. 1, p. 158-178, 2020.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 1 jul. 2003.

OECD/OCDE. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. n.236, 2013.

OMMEN, P.; ZOBEK, N.; MEYER, R. L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **J Microbiol Methods**, v. 141, p. 87-89, 2017.

PAGANO, P.J. et al. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **Int J Antimicrob Agent**, v. 23, p. 226-234, 2004.

PAIVA, L. F. et al. Association of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf with nystatin against oral cavity yeasts. **An Acad Bras Cienc**, v. 94, n. 1, 2022.

PALADINE, H. L.; DESAI, U. A. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. **Am Fam Physician**, v. 97, n. 5, p. 321-329, 2018.

PAPPAS, P. G. et al. Infectious Diseases Society of America. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 2, p. 161-189, 2004.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, 2018.

PECORARO, R. et al. Artemia salina: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. **Microsc Res Tech**, v. 84, n. 3, p. 531-536, 2021.

PEREIRA, F. O. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Thichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Braz J Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 233-242, 2011.

PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **J Appl Microbiol**, v. 131, 2020.

PILLARD, D. A.; TAPP, K. L. Influence of feeding and organism age on the acute toxicity of sodium bromide to Artemia salina. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 5, p. 914-918, 2021.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. Candida survival strategies. **Adv Appl Microbiol**, v. 91, p. 139-235, 2015.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clin Microbiol Infect**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

QADRI, H. et al. Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. **Saudi J Biol Sci**, v. 29, n. 9, 2022.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RHODES, J.; FISHER, M. C. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. **Curr Opin Microbiol**, v. 52, p. 84-89, 2019.

RODRIGUES, G. M. F. **Avaliação da atividade antifúngica in vitro da molécula 2-bromo-N-fenilacetamida contra isolados de *Candida glabrata* oriundas da cavidade bucal.** 2019. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

RODRIGUES, L.B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz J Microbiol**, v. 41, p. 1082-1085, 2010.

ROKAS, A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. **Nat Microbiol**, v. 7, p. 607–619, 2022.

ROSA, J. G. S.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Zebrafish Larvae Behavior Models as a Tool for Drug Screenings and Pre-Clinical Trials: A Review. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 12, 2022.

SADEGHI, G. et al. Cutaneous candidiasis in Tehran-Iran: from epidemiology to multilocus sequence types, virulence factors and antifungal susceptibility of etiologic *Candida* species. **Iran J Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 267-279, 2019.

SAHIN, F. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plantes used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SALAZAR, S. B. et al. An Overview on Conventional and Non-Conventional Therapeutic Approaches for the Treatment of Candidiasis and Underlying Resistance Mechanisms in Clinical Strains. **J Fungi**, v. 6, n. 1, 2020.

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

SAMPAIO, G. M. M. et al. Synthesis and antibacterial activity of a new derivative of the meldrun acid: 2,2-dimethyl-5-(4H-1,2,4-triazole-4-ylaminomethylene)-1,3-dioxane-4,6-dione (C9H10N4O4). **EXCLI Journal**, v. 13, p. 1022-1028, 2014.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SHIN, S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 5, p. 389, 2003.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 41-42.

SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **J Mycol Med**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2017.

SOBEL, J. D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert Opin Pharmacother**, v. 19, n. 9, p. 971-977, 2018.

SOUSA, R. P. M. **Análise da atividade antifúngica *in vitro* de 2-bromo-N-fenilacetamida frente às espécies de *Candida* provenientes de um Hospital Universitário**. 2019. 41 f. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

STRICKLAND, A. B.; SHI, M. Mechanisms of fungal dissemination. **Cell Mol Life Sci**, v. 78, n. 7, p. 3219-3238, 2021.

SUN, F. J. et al. Recent progress on anti-*Candida* natural products. **Chin J Nat Med**, v. 19, n. 8, p. 561-579, 2021.

SUN, Y. et al. Givinostat exhibits *in vitro* synergy with posaconazole against *Aspergillus* spp. **Med Mycol**, v. 55, n. 7, p. 798-802, 2017.

TERRERO-SALCEDO, D.; POWERS-FLETCHER, M. V. Updates in laboratory diagnostics for invasive fungal infections. **J Clin Microbiol**, v. 58, 2020.

TILLY, A.; THARMALINGAM, S. Review of Treatments for Oropharyngeal Fungal Infections in HIV/AIDS Patients. **Microbiol. Res**, v. 13, p. 219-234, 2022.

TORTORANO, A. M. et al. Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. **Infect Drug Resist**, v. 14, p. 5543-5553, 2021.

TÓTH, R. et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. **Clin Microbiol Rev**, v. 32, 2019.

WANG, D. et al. *Candida tropicalis* distribution and drug resistance is correlated with ERG11 and UPC2 expression. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 10, n. 1, 2021.

WANG, X. et al. Synthesis and antifungal activity evaluation of new heterocycle containing amide derivatives. **Nat Prod Res**, 2015.

WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Front Microbiol**, v. 7, 2017.

WU, B. et al. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127-140, 2019.

XIANG, F. et al. The Efficacy of Composite Essential Oils against Aflatoxigenic Fungus *Aspergillus flavus* in Maize. **Toxins**, v. 12, n. 9, 2020.

XIE, H. et al. Structure-activity relationships in the binding of chemically derivatized CD4 to gp120 from human immunodeficiency virus. **J Med Chem**, v. 50, n. 20, p. 4898-4908, 2007.

XU, J. Is Natural Population of *Candida tropicalis* Sexual, Parasexual, and/or Asexual? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, 2021.

YASSIN, Z. et al. Caspofungin resistance in clinical *Aspergillus flavus* isolates. **J Mycol Med**, v. 31, n. 4, 2021.

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

ZHAI, L. et al. Isolation and identification of *Candida tropicalis* in sows with fatal infection: a case report. **BMC Vet Res**, v. 17, n. 1, 2021.

APÊNDICES – CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA

DOI 10.47402/ed.ep.c23120014331

CAPÍTULO 14

INFECÇÕES POR FUNGOS NO PÉ DIABÉTICO: UMA PROBLEMÁTICA ESQUECIDA?

Bráulio de Almeida Teixeira
Edeltrudes de Oliveira Lima
André Azevedo dos Santos
Francisco Patrício de Andrade Júnior
Brenda Kércya da Silva Farias

RESUMO

O pé diabético é uma entidade clínica que se inicia geralmente com um trauma térmico ou mecânico, com posterior infecção, inflamação, edema, isquemia e necrose. Frequentemente culmina em amputação, reduzindo a qualidade e expectativa de vida do paciente consideravelmente ou mesmo podendo levá-lo a óbito. O caráter das infecções no pé diabético é polimicrobiano, isto é, são compostas pelo menos por fungos e bactérias. Devido ao rápido crescimento de bactérias nas culturas laboratoriais e a atenção que é dada às mesmas, as infecções por fungos no pé diabético são constantemente negligenciadas, conduzindo a uma terapia antimicrobiana ineficaz e mau prognóstico de uma condição clínica que por si só já é bastante complexa. A fim de se investigar com maior profundidade o caráter micótico de tais infecções quanto às espécies envolvidas, objetivou-se realizar uma revisão integrativa da literatura científica nas bases de dados PubMed, Science Direct, MEDLINE e LILACS, utilizando-se os descriptores em saúde “pé diabético” e “micoes”, tal como seus sinônimos e os operadores booleanos “AND” e “OR”. A partir da triagem de 186 estudos iniciais, 21 se enquadraram nos critérios de pesquisa e foram elegidos como a amostra final. Pelo menos 46 espécies distribuídas em vários gêneros foram citadas. As amostras biológicas e os métodos diagnósticos foram diversos. Os microrganismos do gênero *Candida* permaneceram os mais frequentes nas infecções do pé diabético, seguidos pelos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichophyton*. *Candida albicans* foi o microrganismo mais isolado. Espera-se com isso uma maior visibilidade dos fungos em tal entidade clínica, a fim de se obter um tratamento mais eficaz, resultando em maiores expectativa e qualidade de vida para o paciente.

PALAVRAS-CHAVE: Pé diabético; Infecções fúngicas; Diagnóstico laboratorial; *Candida* spp.; *Candida albicans*.

› Nat Prod Res. 2023 Nov 7:1-9. doi: 10.1080/14786419.2023.2277352. Online ahead of print.

Antifungal activity of citronellal against *Trichophyton rubrum* and its predictive mechanism of action by CYP51 inhibition through molecular docking

Francisco Patrício de Andrade Júnior ¹, Rawny Galdino Gouveia ², Cássio Ilan Soares Medeiros ², Bráulio de Almeida Teixeira ¹, Brenda Kercya da Silva Farias ¹, Nayana da Rocha Oliveira ¹, Daniele de Figueiredo Silva ², Edeltrudes de Oliveira Lima ³

Affiliations + expand

PMID: 37933528 DOI: [10.1080/14786419.2023.2277352](https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2277352)

Abstract

The present study aimed to investigate the antifungal activity of citronellal (CIT) against clinical isolates of *T. rubrum* and to show the possible mechanism of action involved. The antifungal potential of CIT was evaluated from the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicide Concentration (MFC) and assays with ergosterol and sorbitol, to elucidate the possible mechanisms of action, and molecular docking. MIC and MFC values ranged from 4 to 512 µg/mL. Regarding the mechanism of action, the monoterpene demonstrated interaction with fungal ergosterol. In addition, it is possible to observe that CIT acts on crucial enzymes for the biosynthesis and maintenance of the fungal cell membrane, due to the ability of the monoterpene to bind to CYP51. The results obtained in this research demonstrate that CIT has the potential to become, in the future, a product for the treatment of dermatophytosis.

Keywords: Citronellal; antifungal activity; antimicrobials; filamentous fungi; trichophyton.



REVISTA OBSERVATORIO DE LA ECONOMIA LATINOAMERICANA

Curitiba, v.21, n.9, p. 11610-11625. 2023.

ISSN: 1696-8352

Eficácia do uso de produtos derivados de plantas em doenças infecciosas e biofilmes bucais: uma revisão integrativa

Efficacy of the use of plant-derived products in oral infectious diseases and biofilms: an integrative review

DOI: 10.55905/oelv21n9-059

Recebimento dos originais: 11/08/2023

ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO: 11/09/2023

André Azevedo dos Santos

Doutorando em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPGPNSB)
Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Endereço: Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa – PB, CEP: 58051-900
E-mail: andreazevedojs@gmail.com

Bráulio de Almeida Teixeira

Mestrando em Farmacologia
Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: braulio.teixeiramobile@gmail.com

David Henrique Xavier Barbosa

Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova, Natal - RN, CEP: 59078-970
E-mail: hhenriquexavier757@gmail.com

Emmanuel Melquiades Araújo

Mestrando em Farmacologia
Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: emmanuel@ltf.ufpb.br

José Lucas Ferreira Marques Galvão

Mestre em Farmacologia
Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: luksfmgalvao_4@hotmail.com



José Roberto Dantas de Andrade Santos
 Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação
 Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
 Endereço: Campus I, Lot. Cidade Universitária - PB, CEP: 58051-900
 E-mail: joserobertodasantos@gmail.com

Nayana da Rocha Oliveira
 Mestranda em Farmacologia
 Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
 Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa - PB
 E-mail: nayrochy@hotmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima
 Doutora em Ciências Farmacêuticas
 Instituição: Universidade Federal da Paraíba
 Endereço: Campus I, Lot. Cidade Universitária - PB, CEP: 58051-900
 E-mail: edelolima@yahoo.com.br

RESUMO

Introdução: O uso de antimicrobianos é muitas vezes necessário no manejo das doenças infecciosas bucais. Infelizmente, essas drogas ocasionam com frequência efeitos colaterais desagradáveis, sendo o mais grave a resistência microbiana. Nesse contexto, produtos derivados de plantas surgem como fontes abundantes de novos compostos biologicamente ativos, de maior potência, eficácia e segurança. Na odontologia, uma das aplicações mais estudadas para esses produtos tem sido justamente no manejo das doenças infecciosas bucais. **Objetivo:** Realizar um levantamento dos ensaios clínicos que avaliaram a eficácia de produtos derivados de plantas no controle do biofilme ou na prevenção e/ou tratamento das principais doenças infecciosas bucais. **Metodologia:** Foram selecionados 28 artigos, por meio de busca eletrônica nas bases MEDLINE/PubMed, SciELO e *Web of Science*. Foram incluídos ensaios clínicos realizados em humanos, em língua inglesa, publicados entre 2014 e 2023, e que avaliassem a eficácia de produtos derivados de plantas no controle de biofilmes bucais ou na prevenção/tratamento da cárie dentária, doenças periodontais, candidíase bucal ou herpes labial. **Resultados e Discussão:** O enxaguante bucal, composto por óleos essenciais ou seus componentes isolados, foi o principal produto testado. Quanto à finalidade, a maior parte dos estudos avaliou a eficácia dos produtos no controle do biofilme ou tratamento das doenças periodontais, principalmente gengivite. Em resumo, a maioria dos estudos encontrou eficácia para os produtos testados quando os comparou a um tratamento padrão ou a algum placebo. **Conclusão:** As evidências aqui encontradas apontam que produtos derivados de plantas têm potencial para representar terapias eficazes na prevenção e tratamento de doenças infecciosas bucais.

Palavras-chave: produtos com ação antimicrobiana, óleos voláteis, compostos fitoquímicos, saúde bucal, placa dentária.



Certificado

Certificamos para os devidos fins que **BRÁULIO DE ALMEIDA TEIXEIRA** ministrou a palestra intitulada "**COINFECÇÃO HIV-CANDIDA**", durante o III Congresso Brasileiro de Doenças Infectocontagiosas On-line, realizado no período de 18 a 21 de setembro de 2023, com carga horária total de 2 horas.

Fortaleza/CE, 21 de setembro de 2023.

Prof. Dr. Vandergue Santos Pereira
Coordenador do evento
Instituto Multiprofissional de Ensino - IME
CNPJ: 36.773.074/0001-08



CÓDIGO DO CERTIFICADO: 37QQ2-QU3M7-09W04-27500

VERIFIQUE AUTENTICIDADE EM: <https://ime.events/certificado/validar/37QQ2-QU3M7-09W04-27500>





I Curso de
FARMACOLOGIA
UNINASSAU JOÃO PESSOA



CERTIFICADO

Certificamos que,

BRÁULIO DE ALMEIDA TEIXEIRA

participou do I Curso de Farmacologia da UNINASSAU - João Pessoa, realizado no Centro Universitário Maurício de Nassau, entre 11 e 12 de novembro de 2022, na qualidade de PALESTRANTE do tema: FARMACOLOGIA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS: ANTIBACTERIANOS.


Erica Pacheco
Diretora Acadêmica.

João Pessoa - PB - Brasil
12 de novembro de 2022


Rayanne Nascimento
030106025
UNINASSAU JOÃO PESSOA


Rayanne Nascimento
Coordenadora dos cursos de
Farmácia e Biomedicina.