



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

THALES LUCIANO BEZERRA SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO *IN VITRO* DE COMPOSTOS TRIAZÓLICOS
CONTRA *Candida* spp.**

CUITÉ – PB

2022

THALES LUCIANO BEZERRA SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO *IN VITRO* DE COMPOSTOS TRIAZÓLICOS
CONTRA *Candida* spp.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de
Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal
de Campina Grande – UFCG CES, Campus Cuité, como
requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia,
sob orientação do professor Dr. Wylly Araújo de Oliveira.

CUITÉ-PB

2022

S237e

Santos, Thales Luciano Bezerra.

Estudo do efeito in vitro de compostos triazólicos contra *Candida spp.* / Thales Luciano Bezerra Santos. – Cuité, 2022.

31 f. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2022.

"Orientação: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira".

Referências.

1. Farmácia – Antifúngicos. 2. Compostos Triazólicos. 3. *Candida spp.* I. Oliveira, Wylly Araújo de. II. Título.

CDU 615.282(043)

THALES LUCIANO BEZERRA SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO *IN VITRO* DE COMPOSTOS TRIAZÓLICOS
CONTRA *Candida spp.***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG CES, Campus Cuité, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob orientação do professor Dr. Wylly Araújo de Oliveira.

Aprovado em ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira
Orientador – UFCG

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano
Membro – UFCG

MSc. Anna Paula de Castro Teixeira
Membro - UFCG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por suas promessas se cumprirem em minha vida, por me fortalecer, capacitar, me dar sabedoria, discernimento, sem Ele eu nada seria e nada faria.

À minha mãe Maria Suely Bezerra de Góis, por ser um exemplo de ser humano, mulher, mãe, amiga, conselheira, sempre será fundamental em minhas conquistas, sempre minha base e referência. Obrigada por seu companheirismo, apoio, conselhos, orações.

Aos meus familiares, Thayse Lucélia Bezerra Santos, João Hélio de Oliveira, Maria Lúcia de Oliveira, João Hélio de Oliveira Filho, pelas palavras de força, carinho, perseverança e pelo apoio de sempre. A minha noiva Alana Karoline Penha do Nascimento que me auxiliou, apoiou e esteve presente nessa caminhada.

Aos meus amigos Gustavo Queiroga, Thays Milena e Fernanda Dias, pela resiliência, o auxílio e a amizade durante toda a graduação.

Ao professor Dr. Wylly Araújo de Oliveira, que me acompanhou e auxiliou na realização deste trabalho, grato pela confiança e paciência. Ao professor Dr. Wellington Sabino Adriano e a Msc. Anna Paula de Castro Teixeira que fizeram parte da banca examinadora, pela contribuição e disponibilidade.

RESUMO

As infecções fúngicas constituem um problema de saúde mundial e o aumento do número de doenças humanas causadas por fungos patogênicos é observado. Entre os muitos tipos de infecções fúngicas, os mais comuns são causadas por *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. A terapia antifúngica disponível para o tratamento dessas infecções é restrita. Os triazóis, que juntamente aos imidazóis estão inseridos na classe dos compostos azólicos, são os agentes antifúngicos mais utilizados devido ao seu alto índice terapêutico, amplo espectro de atividade e perfil de segurança mais favorável. No entanto, a ampla aplicação dos mesmos também levou à resistência grave aos medicamentos, o que reduziu significativamente sua eficácia clínica. Portanto, é altamente desejável desenvolver uma nova geração de agentes antifúngicos triazólicos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antifúngica de compostos triazólicos frente à *Candida* spp. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Fungicida Mínima (CFM) e realizada a associação desses compostos triazólicos com antifúngicos utilizados na prática clínica. A CIM variou de 64 µg/mL a 512 µg/mL, e a CFM também variou de 64 µg/mL a 512 µg/mL. A atividade da associação foi sinérgica para a associação da Anfotericina B e a CS-03. Por isso, é possível concluir que a classe dos triazólicos permanece como uma fonte importante para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Palavras-chave: Antifúngicos, Triazólicos, *Candida* spp.

ABSTRACT

Fungal infections are a worldwide health problem and the increase in the number of human diseases caused by pathogenic fungi is observed. Among the many types of fungal infections, the most common are caused by *Candida* spp., *Aspergillus* spp. and *Cryptococcus* spp. The antifungal therapy available for the treatment of these infections is limited. Triazoles, which together with imidazoles are included in the class of azole compounds, are the most used antifungal agents due to their high therapeutic index, broad spectrum of activity and more favorable safety profile. However, their wide application has also led to severe drug resistance, which has significantly reduced their clinical effectiveness. Therefore, it is highly desirable to develop a new generation of triazole antifungal agents. Thus, the present study aimed to analyze the antifungal activity of triazole compounds against *Candida* spp. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the Minimum Fungicide Concentration (MFC) was determined and the association of these triazole compounds with antifungals used in clinical practice was performed. The MIC ranged from 64 µg/mL to 512 µg/mL, and the CFM also ranged from 64 µg/mL to 512 µg/mL. The association activity was synergistic for the combination of Amphotericin B and CS-03. Therefore, it is possible to conclude that the triazole class remains an important source for the development of new antifungal agents.

Key-words: Antifungals, Triazolics, *Candida* spp.

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1</u>	Associação com a Anfotericina B.....	24
<u>Figura 2</u>	Associação com a Caspofungina.....	24

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u>	Resultados da CIM (em $\mu\text{g/mL}$).....	22
<u>Tabela 2</u>	Resultados da CFM (em $\mu\text{g/mL}$).....	22
<u>Tabela 3</u>	Resultados da associação do novo triazólico com a Caspofungina e a Anfotericina B	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – Micrograma

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC – American Type Culture Collection

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DMSO – Dimetilsulfóxido

FICI – Índice de Concentração Inibitória da Fração

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

mL – Mililitro

TTC – 2, 3, 5 - Trifeniltetrazólio

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	11
<u>2</u>	<u>OBJETIVOS</u>	13
<u>2.1</u>	<u>Objetivo geral</u>	13
<u>2.2</u>	<u>Objetivos específicos</u>	13
<u>3</u>	<u>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</u>	14
<u>3.1</u>	<u><i>Candida</i> spp</u>	14
<u>3.1.1</u>	<u>Características gerais</u>	14
<u>3.1.2</u>	<u>Epidemiologia das infecções por <i>Candida</i> spp</u>	14
<u>3.2</u>	<u>Antifúngicos sintéticos</u>	15
<u>3.3</u>	<u>Resistência de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos disponíveis atualmente</u>	17
<u>3.4</u>	<u>Importância de se estudar a associação entre fármacos</u>	18
<u>3.5</u>	<u>Desenvolvimento de novas moléculas</u>	18
<u>5</u>	<u>METODOLOGIA</u>	19
<u>5.1</u>	<u>Local de Trabalho</u>	19
<u>5.2</u>	<u>Meio de Culturas</u>	19
<u>5.3</u>	<u>Cepas Fúngicas</u>	19
<u>5.4</u>	<u>Compostos Triazólicos</u>	20
<u>5.5</u>	<u>Inóculo</u>	20
<u>5.6</u>	<u>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</u>	20
<u>5.7</u>	<u>Concentração Fungicida Mínima (CFM)</u>	20
<u>5.8</u>	<u>Estudo de Associação</u>	20
<u>6</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	21
<u>7</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	25
	<u>REFERÊNCIAS</u>	26

1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por fungos aumentaram rapidamente e tornaram-se uma das maiores preocupações para a saúde humana. Entre várias espécies de fungos, *Candida* e *Aspergillus* são considerados os patógenos fúngicos mais comuns, responsáveis pela maioria das infecções fúngicas que ocorrem em todo o mundo (NEHRA et al., 2021).

As infecções fúngicas são um grave problema de saúde pública. A incidência de infecções fúngicas em pacientes com outras doenças, incluindo Covid-19, está associada a micoses e mortalidade com risco de vida. As infecções fúngicas podem incluir infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas, mucosas e sistêmicas com graus variados de gravidade (REDDY et al., 2022).

As infecções fúngicas constituem um problema de saúde mundial e o aumento do número de doenças humanas causadas por fungos patogênicos é observado. Estas infecções estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade e são muito comuns em pacientes imunocomprometidos como resultado de terapias agressivas (por exemplo, quimioterapia antineoplásica, tratamento a longo prazo com corticosteroides ou transplante de órgãos) e infecções imunossupressoras, como HIV/AIDS (CAMPOY; ADRIO, 2016; MEIRELLES et al., 2016; LUKOWSKA-CHOJNACKA et al., 2016).

Organismos como *Candida* spp. fazem parte da microbiota humana que podem causar infecções oportunistas em indivíduos e infecções potencialmente fatais (candidíase invasiva) em pacientes imunocomprometidos, como pacientes com HIV, pacientes com câncer que recebem quimioterapia e pacientes que recebem medicamentos imunossupressores (REDDY et al., 2022). Os fatores de virulência de *Candida* facilitam a colonização microbiana, proliferação e progressão para periodontite; isso, devido à capacidade desses microrganismos de coagregar com bactérias do biofilme dental e aderir às células epiteliais (LOMELI-MARTINEZ et al., 2022).

A espécie considerada mais prevalente desse gênero é a *C. albicans*, porém a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* também se destacam em estudos, sendo, portanto, de relevante interesse clínico (ČERNÁKOVÁ et al., 2019). Uma vez que nos últimos anos infecções causadas por essas espécies vêm crescendo de forma significativa, acometendo principalmente, indivíduos que estão imunocomprometidos (PILMIS et al., 2016; OZER, DURMAZ, YULA, 2016; MOTOA et al., 2016; REGINATTO et al., 2020).

Infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. estão associadas com alta taxa de morbimortalidade, maior tempo de internação e altos custos com assistência médica

(REGINATTO et al., 2020). As infecções fúngicas sistêmicas são frequentemente diagnosticadas tardiamente aumentando as taxas de mortalidade. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) declararam de 20 a 24 de setembro de 2021 como a semana de conscientização sobre doenças fúngicas, para educar e destacar a importância do diagnóstico precoce de infecções fúngicas para aliviar os efeitos debilitantes (REDDY et al., 2022).

Os antifúngicos existentes no mercado são limitados, sendo necessária a constante busca por novos compostos bioativos que atuem em diferentes alvos terapêuticos. As classes principais desses antifúngicos disponíveis são derivados azólicos, equinocandinas, poliênicos e análogos de nucleosídeos (GUZZETTI et al., 2017).

O desenvolvimento de resistência aos antifúngicos disponíveis (geralmente azólicos) também é um fator alarmante. Os agentes antifúngicos azólicos comumente usados são fluconazol, itraconazol, miconazol e voriconazol, que apresentam atividade antifúngica de amplo espectro. Os azólicos têm atividades de amplo espectro contra a maioria das leveduras e fungos filamentosos e são a droga de escolha para a quimioterapia por interferir no processo de biossíntese do ergosterol por meio de um mecanismo no qual o átomo heterocíclico de nitrogênio (N-4 do triazol) se liga ao átomo de ferro heme. No entanto, o uso crescente desses antifúngicos levou ao aumento da resistência a esses medicamentos (SHAIKH et al., 2020).

Em comparação com o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, o desenvolvimento de drogas antifúngicas é mais desafiador porque os fungos são organismos eucariotos e muitos alvos potenciais para terapia também são encontrados em células humanas com risco substancial de toxicidade do paciente (Campoy; Adrio, 2016).

Os heterociclos contendo tiazol têm atraído interesse contínuo por causa de suas atividades biológicas variadas, incluindo atividade antimicrobiana, anticancerígena, antimalárica, antiviral e atividade do SNC. O anel triazol tem sido relatado como um importante agente antifúngico principalmente devido à sua capacidade de ligação de hidrogênio, caráter dipolar moderado e alta estabilidade metabólica. No entanto, o uso prolongado de drogas antifúngicas tem direcionado a um aumento da resistência a essas drogas (NEHRA et al., 2021).

Com base nessas estimativas de estudo, é necessário fortalecer este campo de pesquisa para desenvolver drogas antimicrobianas e antifúngicas novas e relativamente eficazes. Tratamentos com drogas padrão como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e outros desenvolvidos durante o século 20, não conseguiram controlar a resistência antimicrobiana emergente em alguns aspectos, persistindo a transmissão ineficaz aos micróbios. Portanto, na química medicinal atual, há uma necessidade

urgente de projetar e desenvolver novas estratégias para construir uma nova geração eficaz de agentes antimicrobianos com diferentes mecanismos de trabalho para suprimir a resistência a antibióticos para uso futuro (BITLA, et al., 2021).

Nesse sentido, o presente estudo buscou determinar a atividade antifúngica de compostos triazólicos sintetizados na Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité. Para tal, foram realizados testes para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e a atividade antifúngica da associação entre antifúngicos utilizados na prática clínica e compostos triazólicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de compostos triazólicos frente às cepas de *Candida* spp.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Fungicida Mínima de triazólicos contra *Candida* spp.;
- Avaliar a associação de antifúngicos já utilizados na prática clínica e compostos triazólicos frente à *Candida* spp.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Candida* spp

3.1.1 Características gerais

O gênero *Candida*, pertence ao reino Fungi, filo Ascomytota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomyces, família Saccharomycetacea, estes microrganismos compreendem cerca de 200 espécies, apresentam-se como leveduras, podendo ser polimórficos. Normalmente, encontra-se vivendo em condições saprófitas (GARCIA, SIQUEIRA, 1988; YAPAR, 2014; SULE et al, 2019).

Esse gênero é composto por leveduras que se apresentam ovóides ou globosas, alongadas ou cilíndricas, geralmente não apiculadas, ogivais ou em forma de frasco, sua reprodução acontece por brotamento multipolar. O pseudomicélio que se forma é encontrado na maior parte das espécies, diferenciado em pseudo-hifa e blastósporos. Clamidósporos e micélio verdadeiro, também podem ser formados. Macroscopicamente tem por características, consistência cremosa, brilhante ou opaca, com coloração branca a creme (DIGNANI et al., 2003; DOI et al., 2016; GUPTA, GUPTA, 2017; GORTHI, 2019).

Espécies do gênero *Candida* residem como comensais, fazem parte da microbiota normal da cavidade oral, da vagina, da uretra, do trato gastrointestinal e dos pulmões de indivíduos saudáveis. No entanto, essas leveduras podem tornar-se patogênicas, quando ocorre ruptura desse equilíbrio com o hospedeiro ou o sistema imune deste encontra-se comprometido (MIOTTO et al., 2004; MONGE et al., 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; LIPKE, 2018; TEDILA et al., 2019).

3.1.2 Epidemiologia das infecções por *Candida* spp

Considerada uma espécie patogênica, a *C. albicans* é frequentemente isolada nos seres humanos com relação a infecções fúngicas, associada em até 50% dos casos desse tipo de infecção (MONTERO et al., 2012; PEMÁN et al., 2012).

Nos últimos anos, infecções fúngicas sistêmicas com risco de vida para o paciente tornaram-se cada vez mais comuns, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos que sofrem de tuberculose, câncer ou AIDS e em casos de transplante de órgãos (SHAIKH et al., 2020).

Segundo estudos realizados, cerca de 4 milhões de pessoas no Brasil têm infecções fúngicas a cada ano. Desse total, 2,8 milhões são infecções causadas por *Candida*, que acometem principalmente pessoas com defesas orgânicas enfraquecidas em razão do uso de medicamentos contra rejeição de órgãos transplantados, câncer, AIDS, do uso intensivo de antibióticos ou de procedimentos invasivos como sondas e cateteres em unidades de terapia intensiva (UTI) (FIORANTI, 2016; ČERNÁKOVÁ et al., 2019).

Estimativas globais mostram que anualmente surjam em média, 700 mil casos de *Candida* spp. invasiva, no entanto, esse valor pode ser ainda maior devido às falhas de diagnóstico em muitos casos. Por muito tempo infecções fúngicas foram negligenciadas pelos órgãos públicos e privados de saúde, pois atingiam um grupo de risco restrito já acometido por outras doenças, mas com o passar do tempo a epidemiologia dessas infecções invasivas tem mudado, a população de pacientes com outras comorbidades tem expandido, atingindo pacientes transplantados, infectados com HIV, com câncer, com sistema imunológico suprimido, idosos, bebês prematuros e aqueles submetidos a cirurgias invasivas (BONGOMIN et al., 2017).

Embora causem mais de 1,5 milhões de mortes ao redor do mundo, uma taxa maior que a das mortes provocadas por malária e tuberculose, as infecções fúngicas continuam sendo negligenciadas, diante esse cenário a criação de novos fármacos, melhorias nas técnicas de diagnóstico e tratamento são fundamentais (GIACOMAZZI et al., 2016).

3.2 Antifúngicos sintéticos

O arsenal antifúngico limitado e a resistência bem documentada contra os agentes antifúngicos disponíveis impulsionam a necessidade de desenvolvimento de estratégias alternativas e eficazes para combater infecções fúngicas. Sendo os fungos eucarióticos, as drogas antifúngicas podem apresentar toxicidade ao hospedeiro. Assim, a citotoxicidade em mamíferos de agentes antifúngicos prospectivos é um critério importante no desenvolvimento de drogas. Várias estratégias têm sido propostas para o desenvolvimento de terapias antifúngicas eficazes. A principal abordagem é o desenvolvimento de novos agentes específicos para células fúngicas (REDDY et al., 2022).

As classes principais de antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* spp. são os poliênicos (anfotericina B e nistatina), que atuam na membrana celular fúngica; azóis (fluconazol, miconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, cetoconazol) atuam em uma das enzimas relacionadas a biossíntese do ergosterol conhecido como um componente da membrana celular fúngica; e equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) que agem na enzima β -1,3-D-glucano sintase da parede celular do fungo (MARSH, MARTIN, 2005; RODRIGUES et al., 2014; MAUBON et al., 2014; VIEIRA, SANTOS, 2017).

Pertencente ao grupo dos poliênicos, a anfotericina B é indicada para formas graves de doença invasiva. São moléculas que atuam na membrana celular fúngica, onde possui grande afeição pelo ergosterol, justificando assim sua especificidade. Como bem, interferem no processo de permeabilidade e com as funções de transporte pela sua capacidade de formar grandes poros na membrana causando distúrbios graves no equilíbrio iônico, com perda de K^+ extracelular, além de utilizar múltiplas vias de sinalização intracelular para indução da morte da levedura (RANG et al., 2011; CHUDZIK et al., 2015).

Os azólicos são agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade, baseados nos núcleos triazol ou imidazol. Atuam inibindo a enzima fúngica lanosterina-14 α -desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas ligadas a esta. No caso de infecção invasiva, um dos mais utilizados é o fluconazol, este sendo um antifúngico triazólico que alcança grandes concentrações no líquido cefalorraquidiano, podendo ser a primeira opção nos casos de meningite fúngica, bem como alcança também boas concentrações no humor vítreo, saliva, pele, unhas e tecido vaginal (RANG et al., 2011; CHUDZIK et al., 2015).

Apesar da sua eficácia e ser considerada “padrão ouro” para o tratamento de candidíase, a anfotericina B apresenta alto grau de toxicidade, na maioria dos pacientes que iniciam a farmacoterapia com este medicamento, além disso, pode provocar alguns efeitos adversos provenientes da infusão, podendo ser, tremores, febre, cefaleia e calafrios. (RANG, 2012; JANOUT et al., 2015).

3.3 Resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos disponíveis atualmente

O desenvolvimento de resistência em patógenos fúngicos aos medicamentos disponíveis é um problema clínico emergente na terapia antifúngica. Vários fatores hospedeiros, fúngicos e ambientais influenciam o desenvolvimento da resistência. Plasticidade fenotípica adaptativa, mutações em genes-alvo seguidas de seleção, aneuploidia cromossômica, reprodução sexual e transferência horizontal de genes são as forças motrizes para o surgimento de resistência antifúngica (REDDY et al., 2022).

O uso profilático de antifúngicos azólicos, particularmente o fluconazol, desde o final da década de 1990, reduziu significativamente a incidência e mortalidade de infecções sistêmicas por *Candida*. No entanto, como consequência, levou a uma mudança de infecções sensíveis ao fluconazol para infecções resistentes ao fluconazol (AHMADI et al., 2019).

Ao longo dos últimos anos a *Candida* spp. passou por uma mudança na epidemiologia, com um aumento de espécies não albicans em pacientes admitidos em UTI's, isso pode estar relacionado ao uso abusivo e indiscriminado de antifúngicos e antibióticos, que causam uma redução na sensibilidade das cepas aos fármacos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; GABARDI et al., 2016).

Moreira e colaboradores (2017) encontraram em seus estudos que as cepas de *Candida* spp. isoladas apresentaram um índice alto de resistência aos antifúngicos azólicos (Miconazol e Fluconazol) estes sendo alguns dos antifúngicos mais utilizados no controle dessas leveduras.

A ascensão da resistência de *Candida* spp., destaca a necessidade de novas moléculas, com novos alvos e novas fontes para o tratamento da candidíase. Esse fato constitui um problema de saúde, tendo em vista que constantemente têm surgido relatos de identificação de cepas fúngicas resistentes a vários fármacos tradicionalmente empregados na terapêutica, em especial as espécies não albicans cujo número de casos de resistência ao fluconazol, e outros derivados azólicos, amplamente utilizados em nível hospitalar com finalidade profilática ou de manutenção, vem aumentando significativamente (PERLIN, 2015; LOCKHART et al., 2017 RODRIGUES et al., 2018).

3.4 Importância de se estudar a associação entre fármacos

Em comparação com a monoterapia baseada em um único medicamento, a terapia combinada sinérgica aumenta a eficácia do medicamento e reduz o surgimento de resistência ao medicamento. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* relataram a eficácia de abordagens combinatórias no tratamento de infecções fúngicas. A atividade sinérgica em abordagens combinatórias é alcançada pelo uso de combinações de drogas que possuem diferentes alvos celulares ou pelo aumento da biodisponibilidade. Os medicamentos usados na terapia combinada são a combinação de dois medicamentos antifúngicos conhecidos ou a combinação de um medicamento antifúngico com um medicamento não antifúngico. As drogas não antifúngicas em terapia combinada têm como objetivo melhorar a eficácia das drogas antifúngicas (REDDY et al., 2022).

A associação entre diferentes antifúngicos viabilizam uma terapia de êxito em relação às monoterapias. Infecções fúngicas estão cada vez mais prevalentes, sendo caracterizadas pelo surgimento de novas cepas multi-resistentes, com isso surge a necessidade de desenvolver outras alternativas terapêuticas e/ou adjuvantes para as infecções sistêmicas. Sendo assim, alguns trabalhos de pesquisa têm direcionado seu foco para a avaliação antifúngica de produtos de origem natural utilizados em associação a fármacos convencionais contra cepas resistentes de *Candida* e isoladamente, permitindo um horizonte de novos estudos e promissoras possibilidades na descoberta de novos tratamentos (HAN et al., 2016).

Antifúngicos com diferentes mecanismos de ação pode representar uma alternativa terapêutica válida e eficaz. Teoricamente, a interação entre dois fármacos pode potencializar a atividade antifúngica de ambos, diminuindo a concentração dos mesmos, a duração do tratamento e consequentemente a emergência de resistências. Sendo uma vantagem da associação o amplo espectro de ação dos antimicrobianos e prevenção de microrganismos resistentes (MUKHERJEE et al, 2005; SPADER, 2017).

3.5 Desenvolvimento de novas moléculas

Diante disso, mesmo com tantos antifúngicos de uso tópico e sistêmico presentes no mercado, essa progressiva resistência aos agentes infecciosos tem influenciado muitos pesquisadores a buscar por novas alternativas de tratamento (SANTOS et al., 2017).

O uso incoerente e, de certa forma, indiscriminado dos antimicrobianos também tem sido uma razão bem explícita que deu origem a uma diversidade de microrganismos resistentes. Este problema emergente fomenta pesquisas que visam o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos e espera-se que estes superem os fármacos atuais tanto em termos de eficácia relacionada à resistência quanto em relação a interações medicamentosas (WIEDERHOLD, 2017).

Assim sendo, uma das estratégias para solucionar a escassez das opções de tratamento seria buscar por novos esquemas de dosagens, combinar antibióticos existentes e o desenvolvimento de novas moléculas (MONTERO et al., 2019).

As novas opções de medicamentos antifúngicos necessitam dispor de um amplo espectro de ação contra fungos, apresentar um melhor perfil farmacocinético para diminuir a periodicidade de dosagem, expor da possibilidade de administração oral e parenteral, conter poucos efeitos adversos e interações medicamentosas (SALCI et al., 2018).

5 METODOLOGIA

5.1 Local de Trabalho

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica (J08) da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité-PB. No qual foram conduzidos experimentos para a determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Fungicida Mínima; Estudo de Associação, utilizando o método de Checkerboard.

5.2 Meio de Culturas

Foi utilizado o Sabouraud Dextrose Broth solubilizado com água destilada e esterilizado em autoclave, a 121°C por 15 minutos, conforme orientações do fabricante.

5.3 Cepas Fúngicas

Para a realização do trabalho, foram utilizadas às cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (ATCC 76485), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

5.4 Compostos Triazólicos

Os compostos triazólicos testados foram o CS-01, CS-02, CS-03, CS-04, CS-05, CS-06, CS-07, CS-08, CS-10, CS-11, CS-14, CS-15, CS-16, CS-18, CS-19 e CS-20 gentilmente cedidos pelo professor Dr. Juliano Rufino.

5.5 Inóculo

O inóculo foi preparado em solução salina a 0,9% e ajustado na escala de 0,5 Mc Farland ($1-5 \cdot 10^6$ UFC/mL).

5.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima dos triazólicos foi realizada pela técnica de microdiluição. Inicialmente, 150µL de Sabouraud Dextrose Broth foram distribuídos em placas de 96 poços. Em seguida, 150µL da solução triazólica foram transferidos para o primeiro poço a uma concentração inicial de 512µg/mL, que foi diluído em série pela remoção de uma alíquota de 150µL do poço mais concentrado para o próximo poço. Alíquotas de 15µL do inóculo apropriado para cada linhagem testada foram distribuídas nos poços de cada coluna da placa (DIAS et al., 2017). Após isso as placas foram colocadas em uma estufa na temperatura de 36°C durante um período de 24 horas. Passado esse tempo às placas foram retiradas da estufa e assim realizada a leitura dos resultados com base no crescimento dos controles. A CIM foi definida como a menor concentração de substância capaz de inibir o crescimento.

5.7 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para a determinação da CFM adicionou-se Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em todos os poços e em seguida as placas foram levadas a estufa durante um período de 5 horas a uma temperatura de 36°C. No momento em que forem retiradas da estufa foi realizada a leitura com base no crescimento dos controles, no qual o controle positivo apresentou uma coloração vermelha e o negativo a coloração do caldo. Essa coloração vermelha apresentada no controle positivo revela a atividade das enzimas desidrogenases. Assim, este método distingue amostras vivas, coradas em vermelho, de amostras não viáveis, que mantêm sua cor (DIAS et al., 2017).

5.8 Estudo de Associação

A investigação *in vitro* da interação entre a Caspofungina e a Anfotericina B com o

triazólico, contra *Candida albicans* (ATCC 76485), teve sua avaliação através do método de *Checkerboard*. Tal método consiste na realização de uma diluição seriada em tubos de ensaio, no qual de um tubo contendo 2mL, de solução das drogas, foi retirado uma alíquota de 1mL e transferida para um outro tubo que já conterá 1mL de água destilada estéril, sendo assim as concentrações testadas para Caspofungina, Anfotericina B e o triazólico variaram de CIMx4 a CIM/8. A etapa seguinte consistiu na distribuição de 50µL da solução de Caspofungina e Anfotericina B, e 50µL da solução triazólica, em micropoços que já continham 100µL de *Sabouraud Dextrose Broth*, de forma que todas as concentrações da Caspofungina e da Anfotericina B foram combinadas com todas as concentrações do triazólico (destinou-se uma microplaca para cada uma das associações, Caspofungina x Triazólico e Anfotericina B x Triazólico). Por fim a cada um dos poços foi adicionado 20µL de inóculo, 6 poços foram destinadas para o controle positivo (Inóculo + Caldo) e negativo (Caldo), e em seguida essas placas foram incubadas por 24h a 36 °C.

A natureza das interações foi avaliada pelo cálculo do índice de concentração inibitória da fração (FICI). O FICI foi calculado pela fórmula:

$$FICI = (FLCc/FLCa) + (FENc/FENa)$$

Onde FLCc é a CIM da Caspofungina ou do Anfotericina B em combinação, FENc é a CIM do triazólico em combinação, FLCa é a CIM da Caspofungina ou do Anfotericina B sozinha e FENa é a CIM do triazólico sozinho. A interação foi considerada sinérgica se o FICI for $\leq 0,5$, parcial sinérgico se FICI for $> 0,5$ e < 1 , aditivo se FICI for $= 1$, não houvesse diferença se o FICI for > 1 e ≤ 4 e antagônico se o FICI for $> 4,0$ (BASSYOUNI et al., 2018).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, para se observar a existência ou não de atividade antifúngica perante as cepas de *Candida*, foram realizados testes para determinar a CIM e a CFM. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1 e 2, e por meio deles foi possível observar que os novos compostos triazólicos apresentaram atividade fungistática e fungicida em diferentes concentrações, podendo destacar a atividade inibitória da substância CS-03, na concentração de 64µg/mL, para a cepa de *Candida tropicalis*.

Tabela 1: Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas dos Compostos Triazólicos frente às cepas de *Candida* spp. (em µg/mL).

Triazólicos	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CS-01	512	SCIM	SCIM	512
CS-02	512	SCIM	SCIM	512
CS-03	128	128	64	256
CS-04	512	SCIM	SCIM	512
CS-05	512	SCIM	SCIM	512
CS-06	512	SCIM	SCIM	512
CS-07	512	SCIM	SCIM	512
CS-08	512	SCIM	SCIM	512
CS-10	SCIM	SCIM	SCIM	SCIM
CS-11	SCIM	SCIM	SCIM	SCIM
CS-14	SCIM	SCIM	SCIM	SCIM
CS-15	512	SCIM	SCIM	512
CS-16	SCIM	SCIM	SCIM	SCIM
CS-18	512	512	SCIM	512
CS-19	SCIM	SCIM	SCIM	SCIM
CS-20	SCIM	SCIM	SCIM	SCIM

* SCIM = Sem CIM nas concentrações testadas.

Tabela 2: Resultados das Concentrações Fungicidas Mínimas dos Compostos Triazólicos frente às cepas de *Candida* spp. (em µg/mL).

Triazólicos	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CS-01	512	SCFM	SCFM	512
CS-02	512	SCFM	SCFM	512
CS-03	256	128	128	512
CS-04	512	SCFM	SCFM	512

CS-05	512	SCFM	SCFM	512
CS-06	512	SCFM	SCFM	512
CS-07	512	SCFM	SCFM	512
CS-08	512	SCFM	SCFM	512
CS-10	SCFM	SCFM	SCFM	SCFM
CS-11	SCFM	SCFM	SCFM	SCFM
CS-14	SCFM	SCFM	SCFM	SCFM
CS-15	512	512	512	512
CS-16	SCFM	SCFM	SCFM	SCFM
CS-18	512	512	SCFM	512
CS-19	SCFM	SCFM	SCFM	SCFM
CS-20	SCFM	SCFM	SCFM	SCFM

*SCFM = Sem CFM nas concentrações testadas.

Além dos medicamentos pertencentes à classe dos triazólicos já existentes no mercado, na literatura há também vários relatos sobre a eficácia de novos compostos triazólicos na inibição do crescimento de diversos fungos. Segundo Tingjunhong Nia e colaboradores (2018), em seus estudos, com novos derivados triazólicos contendo cadeias laterais de alcinilo, duas substâncias exibiram atividade superior ao Fluconazol e Ravuconazol, e atividade comparável ao Voriconazol com valores de CIM80 variando de 0,0156 a 0,5 µg/mL contra todos os fungos testados.

Zhigan Jiang e colaboradores (2014) em seu trabalho, novos derivados triazólicos contendo cadeias laterais de 1,2,3-triazol-piperidina substituídas, relata que algumas de suas substâncias mostraram boa atividade inibitória contra *Candida albicans* e *Candida neoformans*, de tal forma que possuíam melhor atividade contra *Candida albicans* do que o Fluconazol e o Itraconazol. Mas em contrapartida demonstraram diminuição da atividade inibitória contra as espécies *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*.

Os ensaios realizados utilizando o método de *Checkerboard* demonstraram que o novo triazólico apresenta-se sinérgico a Anfotericina B e antagônico a Caspofungina, resultados revelados por meio do cálculo do índice de concentração inibitória da fração (FICI), que possui seus valores representados na Tabela 3. Os resultados do experimento também podem ser observados na Figura 1 e 2, no qual visualmente podemos utilizar os controles positivos e negativos como parâmetro.

Tabela 3: Resultados da associação do novo triazólico com a Caspofungina e a Anfotericina B frente às cepas de *Candida albicans*.

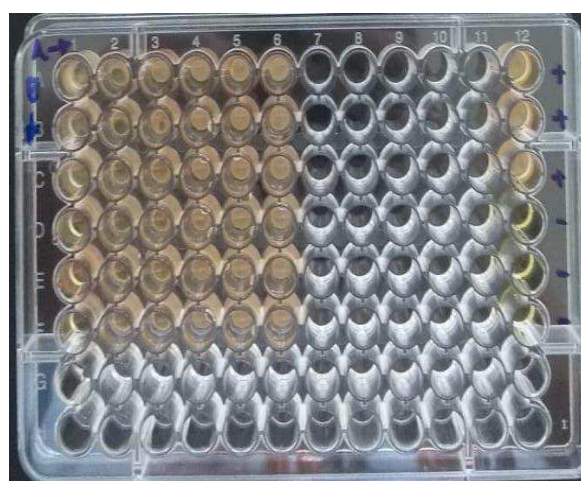
Microrganismo	Substância testada	CIM (em µg/mL)	FICI	Resultado
		Sozinha / Combinada		
<i>Candida albicans</i>	Caspofungina	0,25	4,125	Antagônico
		1		
	Anfotericina B	1	0,25	Sinérgico
		0,125		

* Foi considerado sinérgico se o FICI fosse $\leq 0,5$ e antagônico se o FICI fosse $> 4,0$.

Figura 1: Associação do CS-03 com a Anfotericina



Figura 2: Associação do CS-03 com a Caspofungina.



Ahmadi e colaboradores (2019) em seu trabalho, Sinergia *in vitro* de equinocandinas com triazóis contra isolados do complexo de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol, relata que um método alternativo para o tratamento de casos resistentes é o uso de uma combinação de duas drogas com diferentes mecanismos de ação que necessita de estudos *in vitro*. Seu estudo demonstrou que a atividade antifúngica de triazóis (itraconazol, fluconazol) combinado com equinocandinas (anidulafungina, micafungina) foi determinada em isolados

do complexo *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. Seus resultados mostraram sinergismo para todas as combinações.

Chassot e colaboradores (2019), em um estudo realizado em 2019 investigaram as combinações de anfotericina B, fluconazol, voriconazol e flucitosina contra cepas de *C. parapsilosis* sensíveis e resistentes à equinocandina e seus resultados revelaram que a maioria das interações foi indiferente.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados desse estudo indicou que dentre os compostos testados, o composto triazólico CS-03 apresentou atividade inibitória e fungicida contra as cepas de *Candida* testadas, reforçando que a classe dos triazólicos permanece como uma fonte importante para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. A redução da CIM da Anfotericina B, apresentada no estudo de associação, apresentou-se como um ponto bastante positivo na exploração de potenciais terapias com múltiplos fármacos. Por tanto, esse foi o primeiro trabalho sobre a atividade antifúngica do composto triazólico CS-03, e apresentou-se promissor, podendo instigar pesquisadores a explorar o mecanismo de ação e analisar seus efeitos por completo.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; MAHMOUDI, S.; REZAIE, S.; HASHEM, S. J.; DANNAOUI, E.; BADALI, H.; GHAFARI, M.; AALA, F.; IZADI, A.; MALEKI, A.; MEIS, J.F.; KHODAVAISSY, S. In vitro synergy of echinocandins with triazoles against fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* complex isolates, **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019.
- BARRIUSO, J.; HOGAN, D.A.; KESHAVARZ, T.; et al. Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 5, p. 627–638, 2018.
- BASSYOUNI, R. H.; WALE, I. E.; KAMEL, Z.; KASSIM, M. F. Fennel oil: A promising antifungal agent against biofilm forming fluconazole resistant *Candida albicans* causing vulvovaginal candidiasis. **Journal of Herbal Medicine**, v. 15, p. 1002, 2018.
- BITLA, S.; GAYATRI, A. A.; PUCHAKAYALA, M. R.; BHUKYA, V. K.; VANNADA, J.; BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of Fungi**. v.3, n.57, p. 1-29, 2021.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. **Antifungals. Biochemical Pharmacology**, 2016.
- ČERNÁKOVÁ, L.; LIGHT, C.; SALEHI, B. et al. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. **Infections. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1214, p. 93-123, 2019.
- CHASSOT, F.; VENTURINI, T.P.; PIASENTIN, F.B.; SANTURIO, J.M.; SYIDZINSKI, T.I.E.; ALVES, S.H. Activity of antifungal agents alone and in combination against echinocandinsusceptible and resistant *Candida parapsilosis* strains. **Rev Iberoam Micol**, v. 36, p. 44-47, 2019.
- CHUDZIK, B.; KOSELSKI, M.; CZURYLO, A.; et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **European Biophysics Journal**, v. 44, n. 1-2, p. 77-90. 2015.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 40, n. 3, p. 332–337, 2007.
- DHANAVATH, R.; KUTHATI, B.; KOTHULA, D.; SAGURTHI, S. R.; ATCHA, K. R. Design and synthesis, biological evaluation of bis-(1,2,3- and 1,2,4)-triazole derivatives as potential antimicrobial and antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 41, 2021.

- DIAS, I. J.; TRAJANO, E. R. I. S.; CASTRO, R. D.; FERREIRA, G. L. S.; MEDEIROS, H. C. M.; GOMES, D. Q. C. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, 2017.
- DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSE, E. *Candida*. In : Anaisse E, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. **Medical Mycology**. Philadelphia: Churchill Livingstone; p. 195-239, 2003.
- DOI, A.M.; PIGNATARI, A.C.C.; EDMOND, M.B.; et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, 2016.
- FIORANTI, C. The silent attack of fungi. **Fapesp Magazine**, E d. 243, 2016.
- GABARDI, S.; MARTIN, S.; SURA, M. et al. Micafungin treatment and eradication of candiduria among hospitalized patients. **International urology and nephrology**, v. 48, n. 11, p. 1881– 1885, 2016.
- GARCIA, A.L.; DE SIQUEIRA, A.M. Isolation, identification and serotyping of *Candida albicans* from vaginal secretions. **Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 270-3, 1988.
- GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**. v.59, p.145-150, 2016.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Pathophysiology, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.
- GIONGO, J.L.; VAUCHER, R.A.; FAUSTO, V.P.; et al. Anti-*Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 170-178, 2016.
- GORTHI, L. V. Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). **In Fungal Infections of the Central Nervous System. Springer, Cham: Elsevier**, pp. 23-30, 2019.
- GUPTA, R. K.; GUPTA, P. Opportunistic fungal infections. In Pathology of Opportunistic Infections. **Springer Cham: Elsevier**, p. 53-130, 2017.
- GUZZETTI, L. B.; VESCINA, C. M.; GIL, M. F.; et al. Candidemias in pediatrics: species distribution and sensitivity to antifungal agents. **Argentine Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 320-322, 2017.

- INUI, T.; WANG, Y.; DENG, S.; et al. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1-2, p. 211-5, 2007.
- JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.
- JANOUT, V.; SCHELL, W.A.; THÉVENIN, D.; et al. Taming Amphotericin B. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2021-2024, 2015.
- LIPKE, P.N. What we do not know about fungal cell adhesion molecules. **Journal Fungi**, v. 4, n. 59, 2018.
- LOMELI-MARTINEZ, S. M.; ANDEZ, L. G. A.; VILLANUEVA, J. F. A.; VALENTÍN-GOM, E.; ALEZ, S. R.; ALVAREZ-ZAVALA, M.; SANCHEZ-REYES, K.; CABRERA-SILVA, R. I.; JOS, J.; ANDEZ, V. In vitro Azole antifungals susceptibility of *Candida* spp. isolates from HIV-infected patients with periodontitis. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, 2022.
- LUKOWSKA-CHOJNACKA, E.; MIERZEJEWSKA, J.; MILNER-KRAWCZYK, M.; BONDARYK, M.; STANISZEWSKA, M. Synthesis of novel tetrazole derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 6058-6065, 2016.
- MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**. Ed. 4. Santos: São Paulo-SP, 2005.
- MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Med**, v. 40, n. 9, p. 1241–55, 2014.
- MEIRELLES, G. C.; PIPPI, B.; HATWIG, C.; BARROS, F. M. C.; OLIVEIRA, L. F.S.; POSER, G. L. V.; FUENTEFRIA, A. M. Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericumcarinatum* and fluconazole. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2016.
- MIOTTO, N. M. L.; YURGEL, L. S.; CHERUBINI, K. *et al.* Laboratory methods of identification of *Candida* fungus. **Journal of the Faculty of Dentistry**, Passo fundo, v. 9, n.1, p. 27-33, 2004.
- MONGE, R. A. et al. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, London, v. 152, p. 905-912, 2006.
- MONTERO, J.G.; MARTÍN, A.D.; PIAPPÓN, M.R.P. DE; et al. Invasive fungal infection in patients admitted to critical care areas. **Infectious Diseases and Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 338-343, 2012.

- MONTERO, M. M.; OCHOA, S. D.; CAUSAPÉ, C. L.; VANSKOY, B.; LUQUE, S.; SORLI, L.; CAMPILLO, N.; PADILLA, E.; PRIM, N.; SEGURA, C.; POMAR, V.; RIVERA, A.; GRAU, S.; AMBROSE, P. G.; OLIVER, A.; HORCAIADA, J. P. A combination of colistin and meropenem is synergistic in vitro against extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*, including high-risk clones. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019.
- MOTOA, G.; MUÑOZ, J.S.; OÑATE, J.; et al. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. **Iberoamerican Journal of Mycology**, v. 34, n. 1, p. 17 – 22, 2016.
- MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Review**, v. 18, p. 163-194, 2005.
- NEHRA, N.; TITTAL, R. K.; VIKAS, D. G.; NAVEEN; LAL, K. Synthesis, antifungal studies, molecular docking, ADME and DNA interaction studies of 4-hydroxyphenyl benzothiazole linked 1,2,3-triazoles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1245, 2021.
- PEMÁN J, ZARAGOZA R. There was an early diagnosis of invasive candidiasis in a critically ill patient. **Iberoamerican Journal of Mycology**, v. 29, n. 2, p. 71-75, 2012.
- PERLIN, D.S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p 382-392, 2017.
- PILMIS, B.; PUEL, A.; LORTHOLARY, O.; et al. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 681 – 687, 2016.
- RANG, H. P. Antifungal Drugs. **Rang & Dale Pharmacology**, n.7, p. 758-763, 2012.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; et al. In: Antifungal Drugs. **Pharmacology**. Elsevier, Ed. 7. 2011.
- REDDY, G. K. K.; PADMAVATHI, A. R.; NANCHARAI, Y.V. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, 2022.
- REGINATTO, P.; BERGAMO, V. Z.; BERLITZ, S. J.; et al. Rational selection of antifungal drugs to propose a new formulation strategy to control *Candida* biofilm formation on venous catheters. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.
- RODRIGUES, C. F.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. C. R. Promising alternative therapeutics for oral candidiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, 2018.

- RODRIGUES, C.; RODRIGUES, M.; SILVA, S.; et al. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come?. **Journal Fungi** v. 3, n. 1, p. 11, 2017.
- RODRIGUES, M.E.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; et al. Novel strategies to fight *Candida* species infection. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1–13, 2014.
- SALCI, T. P.; NEGRI, M.; ABADIO, A. K. R.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, E. S. Segmentação *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug Discovery Magazine Today**, v. 23, Ed. 4, p. 802-814, Abr. 2018.
- SANTOS, M. G. C.; NÓBREGA, D. R. M.; ARNAUD, R. R.; SANTOS, R. C.; GOMES, D. Q. C.; PEREIRA, J. V. *Punica granatum* Linn. in the prevention of oral candidiasis in patients undergoing antineoplastic treatment. **UNESP Dental Journal**, v. 46, n. 1, Araraquara, 2017.
- SHAIKH, M. H.; SUBHEDAR, D. D.; AKOLKAR, S. V.; NAGARGOJE, A. A.; KHEDKAR, V. M.; SARKAR, D.; SHINGATE, B. B. Tetrazoloquinoline-1,2,3-Triazole Derivatives as Antimicrobial Agents: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Study. **Polycyclic Aromatic Compounds**, p. 1920-1941, 2020.
- SPADER, T. B. Evaluation of *Rhodotorula mucilaginosa* susceptibility to antifungal combinations with different drugs. **Federal University of Rio Grande do Sul**, 2017.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, 2013.
- SULE, H.; KUMURYA, A. S.; SHEMA, F. B. Candidiasis Opportunistic Mycosis within Nigeria: A Review UMYU. **Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2019.
- TEDILA, H.; ASSEFA, A.; HAJI, F. Candidiasis and opportunistic mycosis in human. **Novel Research in Microbiology Journal**, v. 3, n. 1, p. 190-203, 2019.
- VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. S. Mechanisms of *Candida albicans* resistance to the antifungals amphotericin B, fluconazole and caspofungin. **Brazilian Journal of Clinical Analysis**, v. 49, n. 3. P. 235-9, 2017.
- WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 249-259, 2017.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.10, n.95, p.105, 2014.