



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

BRENDA LAVÍNIA CALIXTO DOS SANTOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ASSOCIAÇÃO DE ADUTOS  
DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN COM ANTIFÚNFICOS SINTÉTICOS  
CONTRA ESPÉCIES DE *Candida spp***

CUITÉ-PB  
2018

BRENDA LAVÍNIA CALIXTO DOS SANTOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ASSOCIAÇÃO DE ADUTOS  
DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN COM ANTIFÚNFICOS SINTÉTICOS  
CONTRA ESPÉCIES DE *Candida spp***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Farmacêutica.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

CUITÉ-PB

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Rosana Amâncio Pereira – CRB 15 – 791

S237e Santos, Brenda Lavínia Calixto dos.

Estudo da atividade antifúngica da associação de adutos de Morita-Baylis-Hilman com antifúngicos sintéticos contra espécies de *Candida* spp./ Brenda Lavínia Calixto dos Santos. – Cuité: CES, 2018.

40 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2018.

Orientador: Wylly Araújo de Oliveira

1. Antifúngicos sintéticos. 2. *Candida*. 3. adutos de Morita-Baylis-Hilman. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

BRENDA LAVÍNIA CALIXTO DOS SANTOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ASSOCIAÇÃO DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN COM ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS CONTRA ESPÉCIES DE *Candida spp***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Farmacêutica.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

APROVADO EM: 29/ 05/ 2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Wylly Araújo de Oliveira - UFCG

Orientador

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Egberto Santos Carmo - UFCG

Examinador

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros - UFCG

Examinadora

CUITÉ - PB

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado força e saúde para superar todas as dificuldades que surgiram nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais Veraneide Calixto e José Clodoaldo e meu irmão, Brendo Calixto, pelo exemplo que são, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem à lutar pelos meus sonhos.

Ao meu noivo, João Paulo, que compartilhou comigo esse momento e foi paciente nos momentos de estresse.

Minhas amigas, Raiane e Alana, por estarem ao meu lado, e me fazerem vivenciar uma verdadeira amizade.

Meu orientador, Wylly Araújo, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado. Aos professores Egberto Carmo e Francinalva Medeiros, por terem aceitado o convite de participar da minha banca examinadora.

Meus professores, pelos conselhos e por me inspirarem para que eu chegasse até aqui.

A todos, que contribuíram direta ou indiretamente, para a conclusão desse trabalho.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

## RESUMO

SANTOS, B. L. C. **Estudo da atividade antifúngica da associação de Adutos de Morita-Baylis-Hillman com antifúngicos sintéticos contra espécies de *Candida* spp.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2018.

Os fungos do gênero *Candida* são patógenos oportunistas, comumente encontrados na microbiota normal humana, sendo a candidíase uma das micoses oportunistas mais comuns em todo mundo, acometendo principalmente, imunocomprometidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica da associação do Aduto de Morita-Baylis-Hillman com drogas sintéticas sobre espécies de *Candida*. Os ensaios para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados através da técnica de microdiluição, e os ensaios da associação foram realizados pela técnica de *checkboard*. Os adutos de Morita-Baylis-Hillman, apresentaram atividade antifúngica frente cepas de *Candida albicans* e ausência de atividade contra cepas de *Candida* não-*albicans*. Além disso, a associação do aduto de Morita-Baylis-Hillman com o antifúngico sintético caspofungina mostrou-se sinérgica, atividade importante devido a busca de novas substâncias que venham incrementar as opções de farmacoterapia, ampliando o espectro de ação de antibióticos, enquanto a associação com a anfotericina B foi indiferente.

**Palavras-chave:** *Candida*, Adutos de Morita-Baylis-Hillman, Antifúngicos sintéticos.

## ABSTRACT

SANTOS, B. L. C. **Study of the antifungal activity of the association of Morita-Baylis-Hillman Adducts with synthetic antifungals on *Candida* species.** 2018. Course Completion Work (Graduation in Pharmacy) - Federal University of Campina Grande, Cuité, 2018.

*Candida* fungi are opportunistic pathogens, commonly found in the normal human microbiota, and candidiasis is one of the most common opportunistic mycoses worldwide, mainly affecting immunocompromised individuals. The objective of the present study was to evaluate the antifungal activity of the Morita-Baylis-Hillman Adduct association with synthetic drugs on *Candida* species. The tests to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were performed using the microdilution technique, and the association tests were performed using the checkboard technique. Morita-Baylis-Hillman adducts showed antifungal activity against strains of *Candida albicans* and absence of activity against strains of *Candida non-albicans*. In addition, the association of the Morita-Baylis-Hillman adduct with the synthetic antifungal caspofungin was synergistic, an important activity due to the search for new substances that would increase the options of pharmacotherapy, increasing the spectrum of action of antibiotics, while the association with amphotericin B was indifferent.

**Key words:** *Candida*, Morita-Baylis-Hillman Adducts, Synthetic antifungals.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação do mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos.....	17
<b>Figura 2.</b> Representação do mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos. ....	18
<b>Figura 3.</b> Representação do mecanismo de ação dos antifúngicos equinocandinas.....	19
<b>Figura 4.</b> Aduto de Morita-Baylis-Hillman (A).....	22
<b>Figura 5.</b> Aduto de Morita-Baylis-Hillman (B).....	22
<b>Figura 6.</b> Representação da preparação do inóculo. ....	23
<b>Figura 7.</b> Representação da microdiluição. ....	24

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> - Representação da associação das substâncias testes com os antifúngicos sintéticos.....	26
<b>Tabela 1.</b> Interpretação dos valores de ICIF.....	25
<b>Tabela 2.</b> CIMs dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (aduto A e aduto B) sobre cepas do gênero <i>Candida</i> . ....	27
<b>Tabela 3.</b> CIMs dos antifúngicos caspofungina e anfotericina B. ....	28
<b>Tabela 4.</b> Determinação do do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hillman e a caspofungina frente a cepa <i>Candida albicans</i> ATCC-76645.....	29
<b>Tabela 5.</b> Determinação do do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hillman e a anfotericina B frente a cepa <i>Candida albicans</i> ATCC-76645.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	–	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	–	American Type Culture Collection
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CIF	-	Concentração Inibitória Fracionária
ICIF	-	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
UFMG	-	Universidade Federal de Campina Grande
CES	-	Centro de Educação e Saúde
UFPB	-	Universidade Federal da Paraíba
µL	-	Microlitros
µg	-	Microgramas
µg/mL	-	Microgramas por mililitros
°C	-	Graus Celsius
UFC	-	Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Candida</i> spp</b>	<b>15</b>
3.1.1	Características gerais	15
3.1.2	Habitat	15
3.1.3	Fatores de virulência	15
<b>3.2</b>	<b>Candidíase</b>	<b>16</b>
3.2.1	Características	16
3.2.2	Fatores de risco	17
<b>3.3</b>	<b>Antifúngicos sintéticos</b>	<b>17</b>
3.3.1	Farmacoterapia utilizada na candidíase	17
3.3.2	Resistência fúngica à farmacoterapia	19
<b>3.4</b>	<b>Associação de antifúngicos</b>	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Adutos de Morita-Baylis-Hilman</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
	Local do estudo	22
<b>4.1</b>	<b>Fármacos antifúngicos</b>	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Adutos de Morita-Baylis-Hilman</b>	<b>22</b>
<b>4.4</b>	<b>Microorganismos</b>	<b>22</b>
<b>4.5</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>23</b>
<b>4.6</b>	<b>Inóculo</b>	<b>23</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) - microdiluição</b>	<b>24</b>
<b>4.8</b>	<b>Checkboard</b>	<b>25</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

# 1 INTRODUÇÃO

*Candida* spp são patógenos comensais e oportunistas na presença de fatores predispostos (PEIXOTO et al., 2016) e são comumente encontrados na microbiota normal, colonizando vagina, boca e trato gastrintestinal por exemplo (TAYEL et al., 2010; GOULART et al., 2016). Infecções causadas por espécies desse gênero vem crescendo rapidamente nos últimos anos, sendo a candidíase uma das micoses oportunistas mais comuns em todo o mundo, acometendo principalmente, indivíduos imunocomprometidos e caracterizada pela dificuldade de diagnóstico e tratamento (PILMIS et al., 2016; OZER, DURMAZ, YULA, 2016; MOTOA et al., 2016).

Dentre as infecções causadas por esta espécie, a candidíase oral é uma infecção com alta incidência e prevalência em diferentes populações em todo o mundo (SKUPIEN et al., 2013). As infecções do trato urinário são comumente causadas por *Candida albicans* embora a frequência de espécies de *Candida* não-*albicans* causando essas infecções venha aumentando (OZER, DURMAZ, YULA, 2016). Além disso, essas espécies são capazes de causar infecções intestinais, de pele e candidemia (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

Os fungos apresentam mecanismos que tem como principal função evitar a sua identificação pelo sistema de defesa do hospedeiro, possibilitando o surgimento da infecção, são eles os fatores de virulência. Esses fatores são determinados geneticamente, porém expressos quando em determinadas condições (TAMURA et al., 2007). Dentre os fatores de virulência de *Candida* podemos citar a produção de enzimas extracelulares como fosfolipases e proteinases, atividade hemolítica, capacidade de adesão, variabilidade genotípica, *switching* fenotípico, formação de biofilme e polimorfismo que contribuem para sua patogenicidade (MEZZARI, 2004; TAMURA et al., 2007; RÖRIG, COLACITE, ABEGG, 2009; JOTHIPRAKASAM et al., 2016; GIONGO et al., 2016; ZARDO, PEIXOTO et al., 2016).

O número de fungos resistentes à terapia fornecida vêm crescendo significativamente, assim como as infecções causadas por estes. Dessa maneira, as

espécies de *Candida*, vem apresentando resistência a antifúngicos como anfotericina B, anidulafungina, fluconazol e itraconazol (ABRANTES, MCARTHUR, AFRICA, 2014).

Nos últimos anos, tem aumentado o esforço para descoberta de novos agentes, com baixa toxicidade para o hospedeiro, para combater infecções fúngicas, assim, o estudo de novas drogas potenciais a fármacos mostra-se necessário. Adutos de Morita-Baylis-Hillman são compostos adquiridos através da condensação de aldeídos ou cetonas a alcenos ligados a um grupo retirador de elétrons, em presença de uma amina terciária como catalisador nucleofílico, os quais vem apresentando diversas atividades biológicas como antifúngica e antiparasitária (BASAVIAH, RAO, REDDY, 2007; DAS et al., 2007; LIMA-JUNIOR, VASCONCELLOS, 2012;).

Dessa maneira, a descoberta de novas substâncias com potenciais aplicações, contribuem para a síntese de substâncias bioativas, inclusive fármacos, os quais são utilizados para melhorar a saúde e conseqüentemente qualidade de vida da população (BARBOSA, et al., 2017).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de adutos de Morita- Baylis-Hillman sozinhos e em combinação com a caspofungina e com a anfotericina B contra espécies de *Candida* spp.

### **2.2 Objetivos específicos**

- determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B e da caspofungina contra espécies de *Candida* spp;
- determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman contra espécies de *Candida* spp e
- determinar o padrão de atividade antifúngica da associação dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman com a anfotericina B e a caspofungina, através do método de *Checkerboard* contra espécies de *Candida* spp.

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 *Candida* spp

#### 3.1.1 Características gerais

Os fungos são micro-organismos unicelulares ou pluricelulares e heterótrofos. Dentre eles, destaca-se o gênero *Candida*, onde o mesmo pertence ao reino Fungi, filo Ascomyotota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomyces (DIEZMANN et al., 2014), compreende cerca de 200 espécies, estes micro-organismos apresentam-se como leveduras, podendo ser polimórficos. São normalmente encontrados vivendo em condições saprófitas (GARCIA, SIQUEIRA, 1988, YAPAR, 2014).

Quanto ao mecanismo de reprodução os fungos apresentam dois, assexuada por brotamento ou fissão (GIOLO, SVIDZINSKI, 2010) e sexuada, onde as espécies de *Candida* se reproduzem de forma assexuada por brotamento (GOW, 2013). As colônias dessas espécies podem apresentar-se como lisa ou rugosa, úmida, brilhante e de coloração branca a creme-amarelada, sendo ovais, elípticas ou cilíndricas. Quanto os micro-organismos apresentam-se com média de diâmetro de 3 a 5 µm de comprimento (LOPÉZ-MARTÍNEZ, 2010; SILVA et al., 2012).

#### 3.1.2 Habitat

Espécies do gênero *Candida* compõem a microbiota normal humana, apresentando ampla distribuição a exemplo, cavidade oral, cavidade bucal, cavidade vaginal, e trato gastrointestinal (TAYEL et al., 2010; GOULART et al., 2016).

#### 3.1.3 Fatores de virulência

Estas leveduras tem seu potencial patogênico conhecido, no qual sua patogenicidade é atribuída aos fatores de virulência, que são mecanismos que tem como principal função evitar a sua identificação pelo sistema de defesa do hospedeiro (DIGNANI et al., 2003). Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos quando em determinadas condições (TAMURA et al., 2007)

Dentre estes mecanismos encontram-se a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o polimorfismo com formação de hifas, a 37°C, que auxiliam a

invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases, atividade hemolítica, variabilidade genotípica, *switching* fenotípico, formação de biofilme (DIGNANI et al., 2003, MEZZARI, 2004; TAMURA et al., 2007; RÖRIG, COLACITE, ABEGG, 2009; JOTHIPRAKASAM et al., 2016; GIONGO et al., 2016; ZARDO, PEIXOTO et al., 2016).

## **3.2 Candidíase**

### **3.2.1 Características**

Embora componham a microbiota normal, os fungos do gênero *Candida* em situações de imunossupressão, como doenças autoimunes, rejeição de transplante, alergias, estresse, deficiência nutricional e utilização de imunossupressores, podem apresentar-se como patógenos (NORBERG et al., 2015; RAIMUNDO, DE TOLEDO, 2018), a descoberta do mesmo como patógeno foi realizada por Langenbeck, em 1839 após isolar um micro-organismo da afta bucal de um paciente (SIDRIM, ROCHA, 2004).

As infecções causadas por *Candida* spp, podem ser classificadas como superficiais e sistêmicas, sendo mais comuns as micoses superficiais. Algumas dessas, apresentam-se com sintomatologia branda em pacientes saudáveis. No entanto, infecções sistêmicas podem alcançar a corrente sanguínea, atingindo órgãos e conseqüentemente gerando complicações infecciosas (DIGNANI, SOLOMKIN, ANAISSIE, 2003).

Em casos de infecções por fungos do gênero *Candida*, a *Candida albicans* é a mais comumente isolada, as referências de isolamento variam de 40% dos casos em países da América Latina, até 70% em alguns países nórdicos. (SANDVEN, 2000; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; TORTORANO et al., 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Dentre as candidíases, a candidíase oral destaca-se devido a sua alta incidência e prevalência no mundo (SKUPIEN et al., 2013).

Nos últimos anos, a incidência de *Candida albicans* vem diminuindo, dando espaço as infecções causadas por *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (YAPAR, 2014; GUINEA, 2014).

### 3.2.2 Fatores de risco

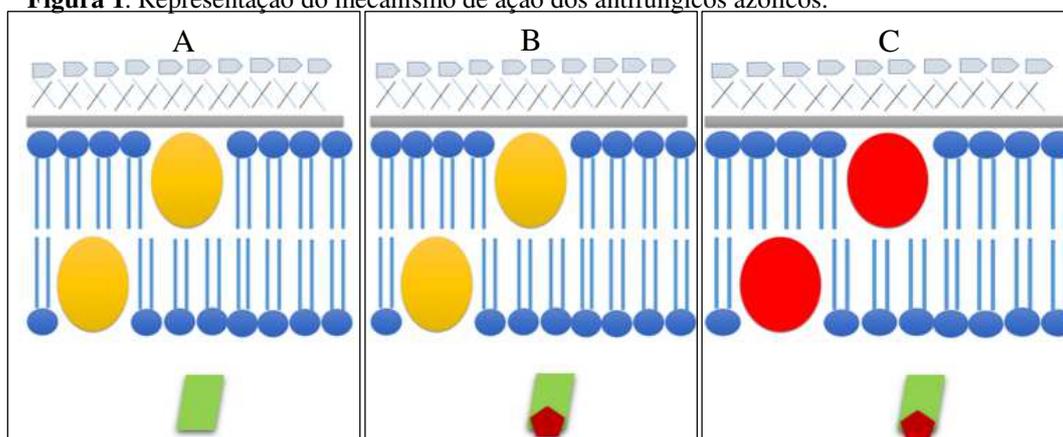
Estudos experimentais tem demonstrado que alguns fatores são fundamentais para a instalação e permanência da infecção fúngica. Dentre os fatores predisponentes mais comuns, encontram-se: imunossupressão, xerostomia, uso de próteses, respiração bucal, alterações endócrinas, discrasias sanguíneas, uso de aparelhos ortodônticos, quimioterapia, sondas, diabetes, antibioticoterapia, queimaduras extensas e cateter (MCCARTY, PAPPAS, 2016; PEMÁM, QUINDÓS, 2016).

### 3.3 Antifúngicos sintéticos

#### 3.3.1 Farmacoterapia utilizada na candidíase

O tratamento de candidíase é feito através da utilização de antifúngicos, que são divididos em classes, sendo as três principais os azólicos, os poliênicos e as equinocandinas. Os azólicos, a exemplo o fluconazol, atuam inibindo a atividade da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase responsável pela biossíntese de ergosterol, levando à acumulação de um esteroide tóxico (14- $\alpha$ -metil-3,6-diol) e à perda da integridade da membrana (Figura 1) (DEORUKHKAR, SAINI, 2015).

**Figura 1.** Representação do mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos.



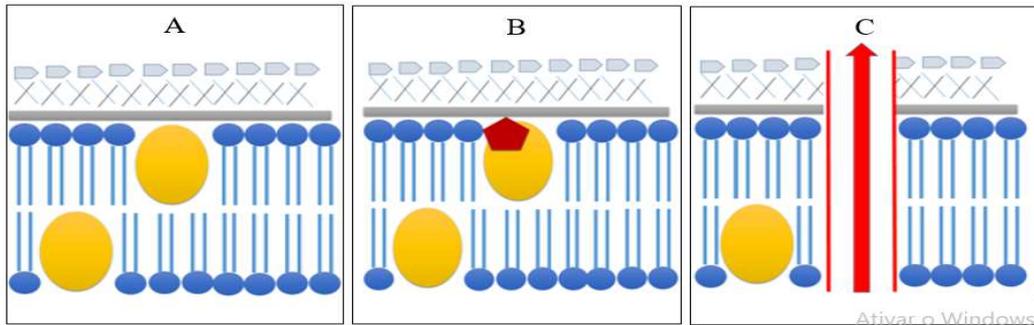
Legenda:

- Fosfolípideo
- Ergosterol
- Fármaco (azólico)
- Esterol tóxico
- Enzima (lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase)
- Parede fúngica

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

Os poliênicos, anfotericina B, atuam ligando-se ao ergosterol e interferem com os poros transmembranares, aumentando a permeabilidade da membrana provocando a morte celular fúngica por perda dos seus componentes (Figura 2) (GROVER, 2010).

**Figura 2.** Representação do mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos.



Legenda:

 - Fosfolípídeo

 - Ergosterol

 - Fármaco (poliênico)

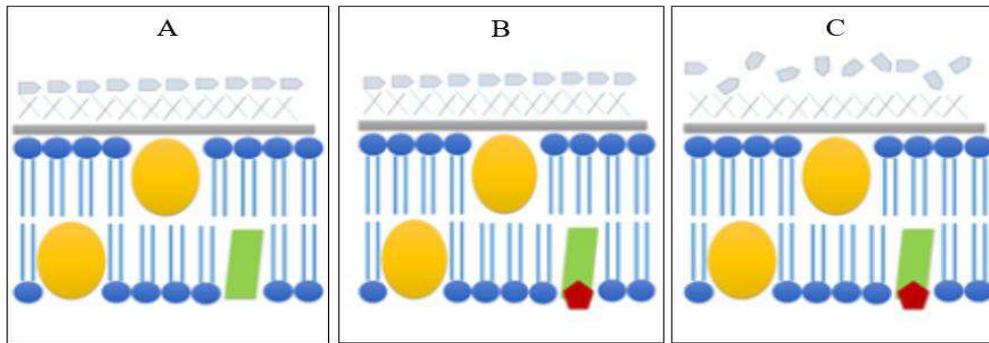
 - Alteração da permeabilidade

 - Parede fúngica

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

Por fim, as equinocandinas, caspofungina, exercem seu mecanismo de ação através da inibição de forma não-competitiva a enzima  $\beta$  (1,3) -D-glucano sintetase, o que inibe a síntese de  $\beta$  (1,3) -D-glucano e afeta a integridade da parede celular fúngica (Figura 3, página 19) (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013).

**Figura 3.** Representação do mecanismo de ação dos antifúngicos equinocandinas.



Legenda:

- Fosfolípídeo
- Ergosterol
- Fármaco (equinocandina)
- Enzima ( $\beta$  (1, 3) glucano sintetase)
- Parede fúngica

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

### 3.3.2 Resistência fúngica à farmacoterapia

Ao longo dos anos, vem sendo relatado na literatura o aumento da resistência fúngica à farmacoterapia utilizada. Dentre estes, estudos relatam a resistência de fungos do gênero *Candida* as principais classes de fármaco utilizadas na terapêutica, que são elas, azólicos, poliênicos e equinocandinas (WINGARD, 1995; SANGLARD, ODDS, 2002, MOTTA et al., 2016).

A resistência aos azólicos, como o fluconazol, está sendo atribuída a capacidade do fungo realizar o efluxo do fármaco, através de bombas de efluxo, diminuindo a concentração do mesmo, no sítio de ação (COWEN, STEINBACH, 2008; SANGUINETTI, POSTERARO, LASS-FLÖRL, 2015).

A resistência aos poliênicos como a anfotericina B, é atribuída a mutações no gene ERG3, que participa da síntese do ergosterol, dessa maneira ocorre alterações nos lipídios de membrana (CUENCA-ESTRELLA, 2010; MORIO et al., 2012)

Por fim, a resistência as equinocandinas, caspofungina, está relacionado com mutações nos genes FKS que codificam a enzima  $\beta$  (1,3) -D-glucano sintetase, o que leva a uma diminuição da sua sensibilidade e falha terapêutica (CUENCA-ESTRELLA, 2010; BEYDA, LEWIS, GAREY, 2012).

### **3.4 Associação de antifúngicos**

A utilização de dois ou mais fármacos na terapia de infecções fúngicas é comum na prática clínica, sendo útil a descoberta de substâncias antimicrobianas que combinadas podem acarretar na potencialização do efeito (NIGHTINGALE et al., 2007). As pesquisas por essas substâncias podem demonstrar estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos e tem como objetivo ampliar o espectro de ação. No entanto, melhores resultados são encontrados quando o micro-organismo é sensível a ambos antimicrobianos (DRAGO et al., 2007).

A vantagem da associação consiste em ampliar o espectro de ação dos antimicrobianos e prevenção de micro-organismos resistentes (SPADER, 2017). A associação de substâncias aos antifúngicos podem promover maior eficácia de cada droga, podendo então, diminuir a dose individual das mesmas. O *checkerboard* é umas das técnicas mais utilizadas para avaliação *in vitro* dessa atividade (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

### **3.5 Adutos de Morita-Baylis-Hilman**

Adutos de Morita-Baylis-Hillman são moléculas sintéticas, polifuncionalizadas, adquiridas através da condensação de aldeídos ou cetonas a alcenos ligados a um grupo retirador de elétrons, em presença de uma amina terciária como catalisador nucleofílico (BASAVIAH, RAO, REDDY, 2007), que tem demonstrado diversas atividades *in vitro* como, anti-malária, anti-leismania, anti-tripanosoma, antibacteriana, herbicida, antifúngica, anti-câncer, anti-alérgico e anti-inflamatória. Além disso, são amplamente utilizadas como intermediários para síntese de novos produtos (KUNDU et al., 1999; VASCONCELLOS et al., 2006; BARBOSA et al., 2009; SANDES et al., 2010; BASAVIAH, REDDY, BADSARA, 2010)

Com a pouca inclusão de novos fármacos na farmacoterapia de infecções fúngicas e o avanço da resistência dos micro-organismos, a pesquisa visando descobrir novos agentes, com baixa toxicidade para o hospedeiro, para combater infecções fúngicas, vem ganhando destaque.

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman destacam-se como produtos multifuncionalizados que vem exibindo diversas aplicações biológicas em pesquisas, incluindo antifúngica e antiparasitária (KUNDU et al., 1999; VASCONCELLOS et al., 2006; BARBOSA et al., 2009; SANDES et al., 2010; BASAVIAH, REDDY, BADSARA, 2010). Sendo adquiridos através de através da condensação de aldeídos ou cetonas a alcenos ligados a um grupo retirador de elétrons, em presença de uma amina terciária como catalisador nucleofílico (BASAVIAH, RAO, REDDY, 2007).

Na área de química orgânica, esses compostos ganham destaque como intermediários de reações, por apresentarem características como elevada economia de átomos, reprodutibilidade e bom rendimento. Além disso, os adutos de Morita-Baylis-Hillman apresenta potenciais atividades biológicas como antifúngica e antiparasitária (DAS et al., 2007; LIMA-JUNIOR, VASCONCELLOS, 2012).

## 4 METODOLOGIA

### Local do estudo

O estudo da atividade antifúngica da associação e microbiologia dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman foram realizados no laboratório de Bioquímica, no Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

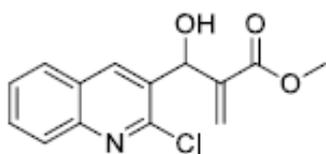
### 4.1 Fármacos antifúngicos

As soluções dos antifúngicos anfotericina B e caspofungina foram preparadas no momento da execução dos procedimentos para o alcance da concentração desejada nos testes.

### 4.2 Adutos de Morita-Baylis-Hillman

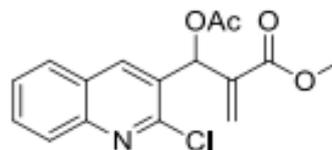
Foi analisada a atividade antifúngica do aduto de Morita-Baylis-Hillman 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metilo (aduto A) (Figura4) e do aduto de Morita-Baylis-Hillman 2 - (acetoxi (2-cloroquinolin-3-il) metil) acrilato de metilo (aduto B) (Figura 5), sintetizados pelo professor Kristerson Reinaldo de Luna Freire, Centro de Biotecnologia, UFPB.

**Figura 4.** Aduto de Morita-Baylis-Hillman (A)



**Fonte:** Elaborada pela própria autora, 2018.

**Figura 5.** Aduto de Morita-Baylis-Hillman (B)



**Fonte:** Elaborada pela própria autora, 2018.

### 4.4 Microorganismos

Para o experimento sobre a atividade antifúngica da associação dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman com antifúngicos sintéticos, foram selecionadas cepas fúngicas do gênero *Candida*, cedidas pelo Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde (UFPB) e cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), são elas:

- *Candida albicans*:
  - ✓ *Candida albicans* LM – 178,
  - ✓ *Candida albicans* ATCC – 76485,
  - ✓ *Candida albicans* LM – 703,
  - ✓ *Candida albicans* ICB 12,
  - ✓ *Candida albicans* ATCC – 76645.
- *Candida não-albicans*:
  - ✓ *Candida guilliermondii* LM-103,
  - ✓ *Candida tropicalis* 10,
  - ✓ *Candida tropicalis* ATCC – 13803,
  - ✓ *Candida parapsilosis* ATCC – 20019,
  - ✓ *Candida krusei* 120.

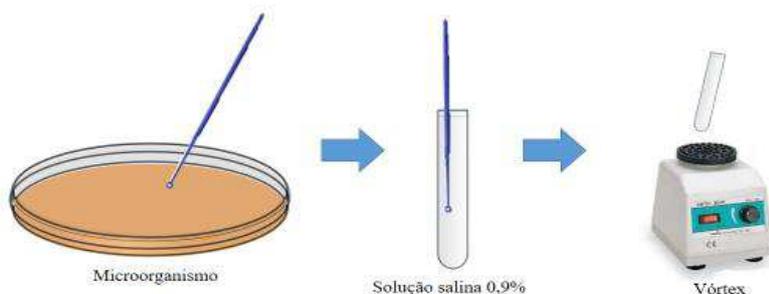
#### 4.5 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado durante os experimentos foi o Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e Caldo Sabouraud Dextrose, preparado conforme as orientações do fabricante.

#### 4.6 Inóculo

Para a preparação do inóculo foram utilizadas cepas fúngicas mantidas em Ágar Sabouraud de 7 – 10 dias. Inicialmente, as suspensões foram preparadas em tubos de ensaio contendo solução salina (NaCl 0,9 %) estéril, em seguida as mesmas foram agitadas com o auxílio do aparelho Vortex, até completa homogeneização. Por fim, a concentração do inóculo fúngico foi ajustada de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala McFarland, que corresponde a aproximadamente  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL (Figura 4).

**Figura 6.** Representação da preparação do inóculo.



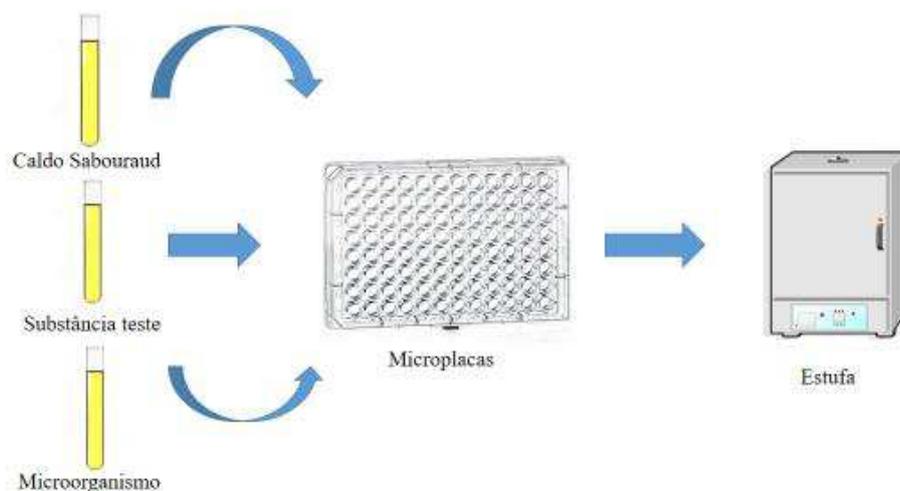
**Fonte:** Elaborada pela própria autora, 2018.

#### 4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) - microdiluição

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado através do método de microdiluição em Caldo Sabouraud (Figura 5) (CASTRO, LIMA, 2010; CASTRO, LIMA, 2011; CORTEZ et al., 2015). O experimento foi realizado em microplacas estéreis contendo 96 cavidades, nas quais foram testadas concentrações do aduto de Morita-Baylis-Hillman, da anfotericina B e da caspofungina entre 1024 e 16  $\mu\text{g/mL}$  diluídos seriadamente de 1:2, o experimento foi conduzido com aproximadamente  $1 - 5 \times 10^5$  UFC/mL em cada cavidade, onde foram adicionados o micro-organismo, caldo sabouraud e a substância teste. Foram utilizados para solubilizar os adutos de Morita-Baylis-Hillman, água, tween e Dimetilsulfóxido (DMSO). Em cada placa foram incluídos controles com tween e DMSO na mesma concentração utilizada na preparação das drogas a serem testadas, e o experimento foi realizado em triplicata.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por 48 h com monitoramento diário. Foi considerado como CIM a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento da levedura.

**Figura 7.** Representação da microdiluição.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora, 2018.

#### 4.8 Checkboard

O ensaio de associação com os antifúngicos, foi realizada através do método de *Checkboard*, com a cepa *Candida albicans* ATCC-76645. O aduto de Morita-Baylis-Hillman (aduto A) e os antifúngicos caspofungina ou anfotericina B, foram adicionados as cavidades da microplaca juntamente com caldo sabouraud, micro-organismo, aduto de Morita-Baylis-Hillman (aduto A) e o antifúngico, sendo os dois últimos dispostos de maneira ordenada: no sentido horizontal, da direita para esquerda, há decréscimo da CIM do aduto de Morita-Baylis-Hillman, e , no vertical, de cima para baixo decréscimo da CIM do antifúngico, como pode ser observado no quadro 1, página 25.

Em cada placa foram incluídos controles, e o experimento foi realizado em triplicata. As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por 48 h com monitoramento diário (CASTRO et al., 2015; HIMRATUL-AZNITA, NOR-ZULAILA, NURUL-FATIHAH, 2016).

Já o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) foi calculada através da seguinte fórmula (DOERN, 2014):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B$$

Em que,

**Tabela 1.** Interpretação dos valores de ICIF.

<b>ICIF</b>	<b>Atividade</b>
<b>&lt; 0,5</b>	Sinergismo
<b>Entre 0,5 e 1</b>	Aditivo
<b>Entre 1 e 4</b>	Indiferente

Fonte: DOERN, 2014.

**Quadro 1** – Representação da associação das substâncias testes com os antifúngicos sintéticos

<b>CIM X 8</b>	CIM X 8 ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM X 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM X 8 ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM X 8 ADUTO + CIM ANTIF.	CIM X 8 ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM X 8 ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM X 8 ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
<b>CIM X 4</b>	CIM X 4 ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM X 4 ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM X 4 ADUTO + CIM ANTIF.	CIM X 4 ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM X 4 ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM X 4 ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
<b>CIM X 2</b>	CIM X 2 ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM X 2 ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM X 2 ADUTO + CIM ANTIF.	CIM X 2 ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM X 2 ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM X 2 ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
<b>CIM DA ADUTO</b>	CIM ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM ADUTO + CIM ANTIF.	CIM ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
<b>CM / 2</b>	CIM / 2 ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM / 2 ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM / 2 ADUTO + CIM ANTIF.	CIM / 2 ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM / 2 ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM / 2 ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
<b>CIM / 4</b>	CIM / 4 ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM / 4 ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM / 4 ADUTO + CIM ANTIF.	CIM / 4 ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM / 4 ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM / 4 ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
<b>CIM / 8</b>	CIM / 8 ADUTO + CIM /8 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /4 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM /2 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM X 2 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM X 4 ANTIF.	CIM / 8 ADUTO + CIM X 8 ANTIF.
	<b>CIM / 8</b>	<b>CIM / 4</b>	<b>CIM / 2</b>	<b>CIM DO ANTIF.</b>	<b>CIM X 2</b>	<b>CIM X 4</b>	<b>CIM X 8</b>

Fonte: Dado da pesquisa, 2018.

- ADUTO: Substância teste.

- ANTIF.: Antifúngico.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2, pode-se observar o resultado das CIMs dos adutos de Morita-Baylis-Hillman 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metilo (aduto A) e 2 - (acetoxi (2-cloroquinolin-3-il) metil) acrilato de metilo (aduto B) frente às cepas fúngicas, onde observa-se que os mesmos apresentaram atividade antifúngica contra algumas cepas de *Candida albicans*, enquanto não demonstraram atividade contra cepas de *Candida não- albicans*.

**Tabela 2.** CIMs dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (aduto A e aduto B) sobre cepas do gênero *Candida*.

Cepas fúngicas	CIMs (µg/mL)	CIMs (µg/mL)
	Aduto de Morita-Baylis-Hillman (aduto A)	Aduto de Morita-Baylis-Hillman (aduto B)
<i>Candida albicans</i> LM – 703	<b>1024</b>	-
<i>Candida albicans</i> ICB 12	<b>1024</b>	-
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76645	<b>256</b>	<b>1024</b>
<i>Candida albicans</i> LM – 178	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76485	-	-
<i>Candida guilliermondii</i> LM-103	-	-
<i>Candida tropicalis</i> 10	-	-
<i>Candida tropicalis</i> ATCC – 13803	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC – 20019	-	-
<i>Candida krusei</i> 120	-	-

**Fonte:** Dado da pesquisa, 2018.

- : Ausência de atividade nas concentrações testadas.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Já tabela 3, pode-se observar o resultado das CIMs dos antifúngicos caspofungina e anfotericina B frente às cepas fúngicas, onde observa-se que os mesmos apresentaram atividade contra cepas de *Candida albicans* e de *Candida não- albicans*.

**Tabela 3.** CIMs dos antifúngicos caspofungina e anfotericina B.

Cepas fúngicas	CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Caspofungina	Anfotericina B
<i>Candida albicans</i> LM – 703	<b>4</b>	<b>1</b>
<i>Candida albicans</i> ICB 12	<b>128</b>	<b>0,03</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76645	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>
<i>Candida albicans</i> LM – 178	<b>16</b>	<b>0,5</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76485	<b>16</b>	<b>2</b>
<i>Candida guilliermondii</i> LM-103	<b>2</b>	<b>1</b>
<i>Candida tropicalis</i> 10	<b>16</b>	<b>2</b>
<i>Candida tropicalis</i> ATCC – 13803	<b>4</b>	<b>2</b>
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC – 20019	<b>4</b>	<b>2</b>
<i>Candida krusei</i> 120	<b>4</b>	<b>2</b>

**Fonte:** Dado da pesquisa, 2018.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Nas tabelas 4 e 5, encontram-se os valores da Concentração Inibitória Fracionária da associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hillman com os antifúngicos.

**Tabela 4.** Determinação do do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hillman e a caspofungina frente a cepa *Candida albicans* ATCC-76645.

Cepa	CIF <sup>A</sup>	CIF <sup>B</sup>	ICIF	Tipo de interação
<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<b>0.125</b>	<b>0.125</b>	<b>0.25</b>	Sinergismo

**Fonte:** Dado da pesquisa, 2018.

CIF: Concentração Inibitória Fracionária.

ICIF: índice da Concentração Inibitória Francionária.

A: Aduto de Morita-Baylis-Hillman

B: Caspofungina

**Tabela 5.** Determinação do do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hillman e a anfotericina B frente a cepa *Candida albicans* ATCC-76645.

Cepa	CIF <sup>A</sup>	CIF <sup>B</sup>	ICIF	Tipo de interação
<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<b>2</b>	<b>0.25</b>	<b>2.25</b>	Indiferente

**Fonte:** Dado da pesquisa, 2018.

CIF: Concentração Inibitória Fracionária.

ICIF: índice da Concentração Inibitória Francionária.

A: Aduto de Morita-Baylis-Hillman

B: Anfotericina B

Das e colaboradores (2007), demonstraram que o aduto de Morita-Baylis-Hillman (Z) -3- (4-metoxibenzilideno) tiocroman-4-ona apresenta atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* (CIM= 6 µg/ ml) e *Torulopsis glabrata* (CIM=6 µg/ ml) e estudos realizados por Narender (2006), através do método de difusão em Ágar, encontraram que Quinolinas obtidas a partir de adutos de Baylis-Hilman (9-metilciclopenta [g] quinolina-6-onas, 3,8-dimetil-6-quinolinacarboxilato de metilo, 3,8-Dimetil-6-quinolinocarboxilato de etilo) apresentam atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (MTCC 282), *Chrysosporium tropicum* (MTCC 2821), *Rhizopus*

*oryzae* (MTCC 262), *Fusarium moniliforme* (MTCC 1848), e *Curvularia luneta* (MTCC 2030), e atividade bacteriana contra organismos Gram (+), foram eles: *Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Bacillus sphaericus* (MTCC 11), e *S. aureus* (MTCC 96) e contra organismos Gram (-), foram eles: *Chromobacterium violaceum* (MTCC 2656), *Klebsiella aerogenes* (MTCC 39), e *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741), as CIMs variaram de 12,5 a 25 µg/ mL.

A diferença na atividade entre os adutos testados por Das e Colaboradores (2017) e os adutos testados nesse trabalho podem ter ocorrido devido à divergência entre as estruturas químicas das moléculas.

Outros estudos relatam que os adutos de Morita-Baylis-Hillman 3-cloro-5-(trifluorometil) - piridin-2-il-oxi) fenilo e 3-hidroxi-2-metileno-3-(4- fluorofenil) propanonitrilo) apresentam potencial atividade para utilização contra parasitas dos gêneros *Leishmania*, *Schistosoma*, *Plasmodium* e *Trypanosoma cruzi* (LIMA–JUNIOR, VASCONCELLOS, 2012; VASCONCELLOS et al., 2006).

O diferente tipo de interação encontrada entre os fármacos e o aduto de Morita-Baylis-Hillman pode ser atribuído aos mecanismos de ação dos antifúngicos, onde os mesmos atuam em distintos sítios ativos, proporcionando alteração na interação com a substância (REZENDE et al., 2017). A anfotericina B, atua ligando-se ao ergosterol da membrana do micro-organismo e interfere nos poros transmembranares, aumentando a permeabilidade da membrana provocando a morte celular fúngica por perda dos seus componentes. Enquanto a caspofungina, exercem seu mecanismo de ação através da inibição de forma não-competitiva a enzima  $\beta$  (1,3) -D-glucano sintetase, o que inibe a síntese de  $\beta$  (1,3) -D-glucano e afeta a integridade da parede celular fúngica (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013; GROVER, 2010).

Nos últimos anos, tem havido um aumento da resistência aos antimicrobianos, inclusive dos azólicos, tornando as equinocandinas fármacos de primeira escolha para o tratamento de infecções sistêmicas por *Candida*, no entanto, espécies deste gênero já vem exibindo resistência a esta classe de fármacos, como é o caso da *C. glabrata* (WIEDERHOLD, 2016).

Diante do exposto, novas pesquisas mostram-se necessárias para a busca de novos produtos naturais ou sintéticos que possuam atividade antimicrobiana (CUENCA-ESTRELLA, 2010; MORIO et al., 2012).

## 6 CONCLUSÃO

Os antifúngicos sintéticos anfotericina B e caspofungina apresentaram atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*.

O aduto de Morita-Baylis-Hilman 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metilo e o aduto de Morita-Baylis-Hillman 2 - (acetoxi (2-cloroquinolin-3-il) metil) acrilato de metilo apresentaram baixa atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, e ausência de atividade contra cepas de *Candida não- albicans*.

Além disso, a associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hilman 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metilo e o antifúngico caspofungina obtiveram atividade sinérgica, enquanto a interação com a anfotericina B foi indiferente.

Dessa maneira, considerando a necessidade da incorporação de novos antifúngicos na farmacoterapia, o estudo de novas substâncias com potenciais atividades antifúngicas mostra-se essencial para o descobrimento de novos fármacos.

## REFERÊNCIAS

ABRANTES, P.M.S.; MCARTHUR, C.P.; AFRICA, C.W.J. Multi-drug resistant oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. **Diagn Microbiol Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 222-227, 2014.

BARBOSA, H. M., ALBINO, A. M., CAVALCANTE, F. S. A., LIMA, R. A. Abordagem fitoquímica de metabólitos secundários em *Solanum acanthodes* (solanaceae) HOOK. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 1, 2017.

BASAVAIHAH, D.; RAO, K.V.; REDDY, R.J. The Baylis–Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 10, p. 1581 – 1588, 2007.

BEYDA, N.D.; LEWIS, R.E.; GAREY, K.W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **Ann Pharmacother**, v. 46, n. 7-8, p. 1086-1096, 2012.

CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (ocotea odorifera vell.) e alecrim (rosmarinus officinalis l.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599 – 607, 2003.

CORTEZ, L. E. R.; YAMAGUCHI, M. U.; CORTEZ, D. A. G.; PESCO, D. C. S. Avaliação da atividade antifúngica dos óleosessencias de *Lippia alba* (Mill.) *NE Brown*

(Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). **Mundo saúde**, p. 433-440, 2015.

COWEN, L.E.; STEINBACH, W.J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 5, p. 747-64, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. **Revista Española Quimioter**, v. 23, p. 169-176, 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854 – 869, 2004.

DAS, B.; CHOWDHURY, N.; DAMODAR, K.; BANERJEE, J. A. Mild and Efficient Stereoselective Synthesis of (Z)-and (E)-Allyl Sulfides and Potent Antifungal Agent,(Z)-3-(4-Methoxybenzylidene) thiochroman-4-one from Morita-Baylis-Hillman Acetates. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 55, n. 8, p. 1274-1276, 2007.

DOERN, C.D. When Does 2 plus 2 Equal 5? A review of Antimicrobial Synergy Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124-4128, 2014.

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

DIEZMANN, S.; COX, C.J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5624—5635, 2004.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M. A. *Candida* (eds) **Medical Mycology**, p. 195-239, 2003.

DRAGO, L.; DE VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M.R. In vitro evaluation of antibiotic combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant

Staphylococcus aureus severe respiratory infections. **BMC Infectious Disease**, v. 7, n. 1, p. 111, 2007.

GARCIA, A.L.; DE SIQUEIRA, A.M. Isolamento, identificação e sorotipagem de *Candida albicans* a partir de secreção vaginal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 270-3, 1988.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V. 46, p. 225-234, 2010.

GIONGO, J.L.; VAUCHER, R.A.; FAUSTO, V.P.; QUATRIN, P.M.; LOPES, L.Q.S.; SANTOS, R.C.V.; GUNDEL, A.; GOMES, P.; STEPPE, M. 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.

GOULART, L.S.; SANTIAGO, E.F.; RAMON, J.L.; MOURA, S.V.; SILVA, A.R.; SILVA JR, I.F.; CHÁVEZ-PAVONI, J.H.; ARAÚJO, C. Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida* spp. in southern Mato Grosso State, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 4, p. 233-237, 2016.

GOW, N.A.R. Multiple mating strategies. **Nature**, v. 494, p. 45-46, 2013.

GROVER N. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian Journal of Pharmacology** v. 42, n. 1, p. 9, 2010.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 5, p. 10, 2014.

HIMRATUL-AZNITA, W. H.; NOR-ZULAILA, C. O.; NURUL-FATIHAH, K. Antifungal activity of dual combination of hydroxychavicol with commercialized agents against oral *Candida* species. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1696, 2016.

JOTHIPRAKASAM, V.; SAMBANTHAM, M.; CHINNATHAMBI, S.; VIJAYABOOPATHI, S. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 21-24, 2016.

LIMA–JUNIOR, C.G.; VASCONCELLOS, M.L. Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 13, p. 3954-3971, 2012.

LOPÉZ-MARTÍNEZ, R. Candidose, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178-184, 2010.

MCCARTY, T.P.; PAPPAS, P.G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 30, n. 1, p. 103-24, 2016.

MOTOA, G.; MUÑOZ, J.S.; OÑATE, J.; PALLARES, C.J.; HERNÁNDEZ, C.; VILLEGAS, M.V. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 1, p. 17 – 22, 2016.

MOTTA, F.A.; DALLA-COSTA, L.M.; MURO, M.D.; CARDOSO, M.N.; PICHARSKI, G.L.; JAEGER, G.; BURGER, M. Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. **Jornal de pediatria**, v. 93, n. 2, p. 165-171, 2016.

NORBERG, A.N.; HELENA, A.A.S.; MADEIRA-OLIVEIRA, J.T.; SANCHES, F.G.; RIBEIRO, P.C.; MACHADO, A.N.; FREIRE, N.M.S. Prevalência de candidíase vulvovaginal em mulheres da região da baixada fluminense, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu – FACIG**. v. 12, n. 1, p. 109-114, 2015.

NIGHTINGALE, C.H.; AMBROSE, P.G.; DRUSANO, G.L.; MURAKAWA, T. Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice. **New York Medical**, 2007.

ÖZER, T.T.; DURMAZ, S.; YULA, E. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 9, p. 629-632, 2016.

PEIXOTO, L.R.; ROSALEN, P.L.; FERREIRA, G.L.S.; FREIRES, I.A.; DE CARVALHO, F.G.; CASTELLANO, L.R.; DE CASTRO, R.D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179-185, 2016.

PEMÁM, J.; QUINDÓS, G. Current aspects of invasive diseases caused by *Candida* and other yeast fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 3, p. 133-9, 2016.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PILMIS, B.; PUEL, A.; LORTHOLARY, O.; LANTERNIER, F. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 681 – 687, 2016.

RAIMUNDO, J. D. S., DE TOLEDO, C. E. M. Plantas com atividade antifúngica no tratamento da candidíase: uma revisão bibliográfica. **revista Uningá Review**, v. 29, n. 2, 2018.

RÖRIG, K.C.O.; COLACITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-7, 2009.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p.2-13, 2015.

SANGLARD, D.; ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, n. 3, p. 73-81, 2000.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. **Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro**, p. 408, 2004.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, O.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, Pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology reviews**, v. 35, n. 2, p. 288-305.

SKUPIEN, J.A.; VALENTINI, F.; BOSCATO, N.; PEREIRA-CENCI, T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 110, n. 5, p. 356-362, 2013.

SPADER, T. B. Avaliação da suscetibilidade de *Rhodotorula mucilaginosa* frente a associações de antifúngicos com fármacos diversos. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2017.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAYEL, A.A.; MOUSSA, S.; EL-TRAS, W.F.; KNITTEL, D.; OPWIS, K.; SCHOLLMEYER, E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 454-7, 2010.

TORTORANO, A.M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 5, p. 359–366, 2006.

VASCONCELLOS, M.L.; SILVA, T.; CAMARA, C.A.; MARTINS, R.M.; LACERDA, K.M.; LOPES, H.M.; HORACIMONE, L.M.; PEREIRA, V.L.P.; SOUZA R.; CRESPO, L.T. Baylis–Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest management science**, v. 62, n. 3, p. 288-292, 2006.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.10, n.95, p.105, 2014.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, v. 63, p. 136-46, 2004.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 115-125, 1995.