



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

JOSIVAN PEREIRA DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO DERIVADO DE  
CARBOIDRATO ENÔNICO CONTRA FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus spp.***

JOSIVAN PEREIRA DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO DERIVADO DE  
CARBOIDRATO ENÔNICO CONTRA FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus spp.***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia, da Universidade Federal de Campina Grande, no Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité-PB, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira.

Cuité-PB  
2020

S586a

Silva Júnior, Josivan Pereira da.

Avaliação da atividade antifúngica do derivado de carboidrato enônico contra fungos do gênero *Aspergillus spp.* / Josivan Pereira da Silva Júnior. – Cuité: CES, 2020.

33 fl. Il.: color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / CES, 2020.

Orientador: Wyly Araújo de Oliveira.

1. Fungos. 2. Atividade antifúngica. 3. Carboidrato enônico. I. Oliveira, Wyly Araújo de. II. Universidade Federal de Campina Grande. III. Título.

CDU 635.8(043)

JOSIVAN PEREIRA DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO DERIVADO DE  
CARBOIDRATO ENÔNICO CONTRA FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus spp.***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia, da Universidade Federal de Campina Grande, no Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité-PB, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 25 de novembro de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira  
Orientador – UFCG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francinalva Dantas de Medeiros  
Membro – UFCG

---

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano  
Membro – UFCG

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao criador de todas as coisas, por ter me guiado nos momentos mais difíceis da minha vida, principalmente por ter mostrado esse caminho para alguém que parecia não ter saída. Por ter me abençoado nessa trajetória, na qual antes nunca imaginaria trilhar.

Agradeço eternamente, aos meus pais, Fabíola Coelho de Araújo Silva e Josivan Pereira da Silva, também a minha família em especial minhas irmãs, pelo carinho e a forma que me apoiaram e criaram grandes expectativas para meu futuro.

Agradeço de coração, a minha companheira nas horas de alegria como também nas de tristeza. A pessoa pela qual resolvi me empenhar ainda mais na minha formação e no meu futuro profissional, para que possamos realizar os nossos sonhos, a minha namorada Danielli Soares Lima.

Meus sinceros agradecimentos a todos os meus amigos, por estarem comigo durante toda essa jornada em meio ao curso e nossa amizade que é tão especial para mim. Nossas brincadeiras, conversas, os estudos madrugada a dentro, sempre juntos nas atividades e claro nos momentos de comemoração. Agradeço a Elioce Wisdom, Gustavo Abraão, Herbert Luan, Letícia Fernandes, Lídio Tiago, Maria Wilma, Monike Ellen e Thaynara Jorge.

Agradeço aos amigos que consegui em meio a iniciação científica, os quais foram muito importantes na minha formação. Os conhecimentos passados por Gustavo Lima, na realização de experimentos, na parceria com Joyse Maria no período difícil em que éramos só nós dois, e finalmente gratidão pela amizade construída com Alison pontes, Paulo Cesar e Thales Santos, que passávamos dias e noites no laboratório juntos, nos esforçando e ajudando uns aos outros em meio as nossas pesquisas.

Quero agradecer aos profissionais que me orientaram nos estágios, que me ensinaram boa parte da prática clínica, foram desde balconistas, técnicas de laboratório até biomédicos e farmacêuticos. Esses profissionais me mostraram o respeito e colaboração multiprofissional, além de deixar um pouco de cada um em mim, na forma de orientar um paciente e dispensar um medicamento, em manusear uma seringa, analisar uma lâmina hematológica, a liberar da melhor maneira um laudo.

Agradeço a Me. Rayane de Oliveira Silva e o Dr. Juliano Carlos Rufino de Oliveira, por disponibilizarem o composto estudado.

Agradeço a Dra. Igara Oliveira Lima, por ter me orientado na iniciação à docência, na qual fui monitor por um período de 2 anos nas disciplinas de microbiologia e imunologia básica, e imunologia clínica, por ela ministradas.

Finalmente agradeço imensamente ao meu orientador, o Dr. Wylly Araújo de Oliveira, o qual acreditou em mim e deu a oportunidade de participar da iniciação científica. Foi quem me ensinou do básico ao avançado de como proceder em um laboratório, sendo algo que levou a me direcionar aos meus futuros objetivos profissionais, além de ter me dado a confiança de repassar o conhecimento recebido por ele aos meus amigos e colegas, para a realização das pesquisas.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica  
nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)

## RESUMO

As infecções fúngicas são um problema crescente na saúde pública, pois, os fungos são seres com uma amplo espectro clínico, além de serem oportunistas podendo causar infecções dos mais variados níveis de gravidade, desde algo superficial até mesmo sistêmico, atingindo órgãos vitais, aumentando os níveis de morbimortalidade dos indivíduos, o que causa um grande impacto na saúde humana. O gênero *Aspergillus spp.* compreende várias espécies, dentre estas a mais comuns em um processo de patogenia e com maior índice de prevalência de infecção temos o *A. fumigatus* seguido de outras espécies como *A. flavus*. Portanto, este trabalho teve como objetivo, investigar o potencial de atividade antifúngica do derivado de carboidrato enônico e sua associação com a anfotericina B contra *Aspergillus spp.* O teste da atividade antifúngica foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, sendo observado sua eficácia antifúngica contra as cepas de *Aspergillus spp.*, inibindo o crescimento dos microrganismos. Na associação com a anfotericina B utilizando a técnica de checkerboard, foi visto que sua combinação resultou na classificação como antagonista. Concluiu-se neste estudo a eficácia e potencial biológico na atividade antifúngica voltado para o composto testado, o derivado de carboidrato enônico, porém devem ser feitos estudos para que haja um melhoramento através da modificação da molécula, gerando um possível aumento em seu espectro de ação e compatibilidade sinérgica com outras substâncias.

**Palavras-chaves:** *Aspergillus spp.*; associação de substâncias; atividade antifúngica; aspergilose.

## ABSTRACT

Fungal infections are a growing problem in public health, as fungi are beings with a clinical spectrum, in addition to being opportunistic and can cause the most varied levels of severity, from something superficial to the same systemic, reaching vital organs, increasing levels of morbidity and mortality of those belonging, which has a major impact on human health. The genus *Aspergillus* spp. comprises several species, among these several species in a pathogenic process and with a higher rate of prevalence of infection, *A. fumigatus* followed by other species such as *A. flavus*. Therefore, this study aimed to investigate the potential of the antifungal activity of the enonic carbohydrate derivative and its association with amphotericin B against *Aspergillus* spp. The antifungal activity test was carried out using the broth microdilution method, and its antifungal efficacy against *Aspergillus* spp. Strains was observed, inhibiting the growth of microorganisms. In association with amphotericin B using a checkerboard technique, it was seen that its combination resulted in classification as an antagonist. In this study, the effectiveness and biological potential of the antifungal activity towards the tested compound, the enonic carbohydrate derivative, were concluded. However, studies should be carried out so that there is an improvement through the modification of the molecule, generating a possible increase in its spectrum of action and synergistic compatibility with other substances.

**Keywords:** *Aspergillus* spp.; association of substances; antifungal activity; aspergillosis.

## LISTA DE FIGURAS

1. <b>Figura 1</b> - Estrutura da Salicina .....	21
2. <b>Figura 2</b> - Procedimento de preparação do inóculo .....	22
3. <b>Figura 3</b> - Método de microdiluição em caldo .....	24
4. <b>Figura 4</b> - Esquema de distribuição entre os compostos no processo de associação .....	25
5. <b>Figura 5</b> - Esquema do cálculo para determinação de ICIF .....	26

## LISTA DE TABELAS

1. **Tabela 1** - valores da CIM\* em  $\mu\text{g/mL}$  das substâncias testadas contra *Aspergillus spp.* 27
2. **Tabela 2** - Associação entre o carboidrato enônico (A) e a anfotericina B (B)..... 29

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AI – Aspergilose Invasiva

AIDS – Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida

ATCC – American Type Culture Collection

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO – Dimetilsulfóxido

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

mL – Mililitro

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

µg – Micrograma

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 Epidemiologia e Infecções fúngicas.....	16
3.2 Epidemiologia e Infecções por <i>Aspergillus spp.</i> .....	17
3.3 Tratamento atualmente disponível.....	18
3.4 Resistência a antimicrobianos.....	18
3.5 O estudo de novas moléculas.....	19
3.6 Associação de substâncias.....	20
3.7 Glicosídeos.....	20
Figura 1.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Local de realização.....	22
4.2 Cepas fúngicas e preparação do inóculo.....	22
Figura 2.....	22
4.3 Substâncias utilizadas.....	23
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	23
Figura 3.....	24
4.5 Associação entre as substâncias.....	24
Figura 4.....	25
Figura 5.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1 Concentração inibitória mínima.....	27
Tabela 1.....	27
5.2 Associação entre as substâncias testadas.....	28
Tabela 2.....	29
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são um problema crescente na saúde pública, pois, os fungos são seres com características oportunistas que podem causar infecções dos mais variados níveis de gravidade, desde algo superficial até mesmo sistêmico, atingindo órgãos vitais, o que causa um grande impacto na saúde humana. Por ter sintomas semelhantes ao de outras doenças, resultam em um retardo nos diagnósticos e tratamentos propostos aos indivíduos infectados, com isso há o aumento dos níveis de morbimortalidade (BENEDICT et al., 2017; BENEDICT; CALUMBY; FOLI; 2019).

O gênero *Aspergillus spp.* compreende aproximadamente 344 espécies, dentre essas a espécie mais comum em um processo de patogenia e com maior índice de prevalência de infecção temos o *A. fumigatus* seguido de outras espécies como o *A. flavus*. Esses microrganismos ocorrem por várias regiões do mundo e em habitats diferentes como no solo, matéria em decomposição e principalmente no ar, sendo facilmente distribuídos devido a fácil adaptação, a rápida reprodução e por sua ampla distribuição pelo processo de esporulação, podendo ser encontradas até 100 conídios fúngicos aproximadamente por metro cúbico de ar (ZAITZ, 2010; SAMSON, 2014; MIGOTT, 2017).

A partir da inalação de conídios podem surgir doenças como o aspergiloma e as aspergiloses tanto a broncopulmonar alérgica quanto a invasiva, que são os três tipos mais comuns de patologias causadas decorrentes da contaminação por esse tipo de fungo filamentosos. Essas infecções podem ser causadas em pacientes que tenham hipersensibilidade, resultando em uma reação alérgica crônica como asma, podendo assim ser potencialmente progressiva, em pacientes com anormalidades pulmonares a colonização pode ser formada nas cavidades já presentes devido ao uso de nicotina como também em pacientes que tenham essas anomalias causadas por outras doenças preexistentes tendo a tuberculose como um exemplo frequente, além de pacientes internados em hospitais com condições imunocomprometidas, pois, pela vulnerabilidade desse indivíduos no processo de recuperação do transplante de órgãos ou medula e até mesmo doenças hematológicas malignas se tornam alvos dessas infecções (PILANIYA, 2015; BENEDICT, 2019; SCHWARTZ, 2020).

Tendo em vista os problemas causados diante a essas enfermidades, é proposto o tratamento realizado pela utilização de uma gama de substâncias nas quais podemos destacar o grupo dos triazóis, que são alguns dos fármacos comumente recomendados para recuperação

do paciente em caso de infecção, sendo composto pelos fármacos itraconazol, posaconazol e a principal indicação dessa classe, o voriconazol (PATTERSON et al., 2016).

Há casos em que devem optar por outras alternativas de terapias, nos quais não se pode ser administrado o voriconazol por ser não tolerado ou contraindicado, podendo ser feito o uso da anfotericina B, que é um polieno muito conhecido e amplamente utilizado contra esse tipo de infecção tendo uma boa eficácia sobre vários patógenos fúngicos, pelo largo espectro de ação (PATTERSON, 2016; LIMA, 2017; TALAS, 2019).

No entanto, há uma grande preocupação direcionada aos microrganismos multirresistentes em relação aos fármacos utilizados, como por exemplo o surgimento de espécies de *Aspergillus fumigatus* resistentes aos azóis, devido a exposição de produtos agrícolas que se assemelham aos fármacos usados nas terapias. Essas espécies resistentes tendem a causar um índice de mortalidade de até 25% maior que *Aspergillus spp.* que não possuem mutação, sendo uma ameaça ao controle de doenças (FISHER, 2018; SEWELL, 2019). Isso traz a necessidade do aprofundamento dos estudos voltados a sintetização de novas moléculas, podendo ser utilizadas em associação a fármacos existentes aumentando a eficácia do método terapêutico.

Diante desse problema, o presente trabalho foi proposto, visando testar um novo composto sintético, com intuito observar um possível sinergismo e potencialização na efetividade da atividade antifúngica no uso em conjunto à anfotericina B *in vitro*, contra as cepas de *Aspergillus spp.*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

✓ Investigar o potencial de atividade antifúngica do derivado de carboidrato enônico sua associação com a anfotericina B contra *Aspergillus spp.*

### **2.2 Objetivos Específicos**

✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do derivado de carboidrato enônico contra cepas de *Aspergillus spp.*;

✓ avaliar a atividade antifúngica da associação do derivado de carboidrato enônico com a anfotericina B.

### 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Epidemiologia e Infecções fúngicas

As infecções fúngicas podem ser encontradas de maneira superficial como na pele, no couro cabeludo e nas unhas, sendo tratadas como algo comum em meio a saúde pública, mas também podem se apresentar de forma severa quando atingem órgãos. A exemplo de problemas mais graves que afetam de forma sistêmica um indivíduo, temos as infecções urinárias nos órgão reprodutores, quando se tem o aumento da colonização de leveduras no trato urinário, também podem ser citados casos de infecção nos pulmões, que são causados por alguns tipos de fungos filamentos. Essas enfermidades são ocasionadas devido à falta de cuidados em relação a higienização local, onde pacientes se encontram internados, podendo levar a complicações maiores, aumentando índice de morbimortalidade em clínicas e hospitais (MENG et al., 2019).

As infecções fúngicas tiveram um aumento considerável nos últimos tempos, por ser cada vez mais comum a utilização de procedimentos invasivos. Essas infecções podem atingir um valor a cerca de 150 milhões de casos graves, causando um nível de mortalidade aproximada a de tuberculose e maior que a malária. Os casos que podem ajudar a aumentar esses números, são de pacientes com a imunidade comprometida, como de casos de indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), doenças pulmonares e com patologias malignas progressivas como o câncer (BONGOMIN et al., 2017).

Essa incidência global pode chegar a uma estimativa maior podendo atingir aproximadamente 80% dos casos que possuem a imunidade comprometida por procedimentos invasivos, mas há uma barreira que dificulta o registro de informações, que é a falta de notificação por parte de órgãos regulatórios de vigilância, causando assim um déficit de informações (BONGOMIN et al., 2017).

Diante de problemas de registro como esses e por falta de dados epidemiológicos, um estudo foi realizado pela Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infecções Invasivas e Subcutâneas (IFIs), englobando os anos de 2013 a 2018, para obter informações sobre a epidemiologia em relação a infecções invasivas e subcutâneas em Portugal, o qual conseguiu o alcançar uma estimativa de registros de 83% dos casos, com dados de 13 distritos, sendo a maioria de Lisboa (VERÍSSIMO et al., 2019). Isso mostra a importância que deve ser dada a

atualização desses dados relacionados aos problemas de saúde, que podem afetar uma parte maior da população mundial, ajudando a informar e educar a todos sobre as formas de prevenção dessas doenças.

### **3.2 Epidemiologia e Infecções por *Aspergillus spp.***

Há um grande número de espécies do gênero *Aspergillus spp.*, mas algumas tem um grande impacto na saúde humana, chegando a ser extraordinárias o contexto envolvendo esse gênero por ter um amplo espectro clínico. As infecções tendem a ser geralmente causadas por *A. fumigatus*, que tem uma taxa de até 90% dos casos ocasionados pelo gênero, seguido do *A. flavus* (PAULUSSEN et al., 2017).

O *A. fumigatus* é o fungo patológico mais proeminente em relação a infecção invasiva dos pulmões, podendo chegar a mais 300.000 casos de aspergilose invasiva e dentre essa estimativa podem ser previstas cerca de 150.000 mortes no mundo anualmente. Isso ocorre por seus conídios terem uma persistência em seu crescimento no trato respiratório, podendo atingir pacientes com processos alérgicos avançados como a asma, assim instalando-se nesses indivíduos que são susceptíveis, agravando seu quadro clínico desenvolvendo aspergilose broncopulmonar (AMICH et al., 2020). Recentemente foi visto que conídios aerossolizados no ambiente seja a principal via que leva à colonização das vias aéreas (ENGEL et al., 2019).

A espécie *A. flavus*, está ligado a vários tipos de patologias, podendo se apresentar como um tipo prevalente a infecções oculares e aspergilose sino-orbital, além disso também estão presentes em infecções no trato respiratório (compreendem 10% dos casos de infecção invasiva pulmonar por fungos) como o *A. fumigatus*, e são diretamente relacionados a sinusites fúngicas, quando há a colonização dos seios nasais por esses microrganismos (RUDRAMURTHY et al., 2019). Essa espécie ainda é responsável por infecções relacionadas a contaminação de pré e pós colheita, que são causadas pela liberação da aflatoxina, podendo resultar em efeitos de imunossupressão, teratogenicidade e até mesmo afetar o crescimento infantil (LEWIS et al., 2019).

Os dados atrelados aos casos de aspergilose invasiva, apontam que anteriormente haviam cerca de 200.000 casos de AI (aspergilose invasiva) no mundo, sendo que após uma atualização foram registrados mais 300.000 casos anualmente, visto que no estudo consistiu em analisar as estimativas de 40 diferentes países, tendo uma soma de aproximadamente 29% da

poluição mundial afetada por esse tipo de infecção. Em particular no Brasil os dados mostrados no estudo, apontam que os 1854 casos registrados de AI no ano de 2016, estavam diretamente ligados a pacientes com doenças preexistentes ou casos de imunossupressão por procedimento invasivo, tendo os seguintes valores em relação as condições clínicas: 13,4% Leucemia mieloide aguda; 2,3% no transplante de células-tronco hematopoiéticas; 0,5% no transplante de rins; 13,3% no transplante de pulmão (BONGOMIN et al., 2017).

### **3.3 Tratamento atualmente disponível**

Atualmente existem vários tratamentos antifúngicos, o que evidentemente implica em dizer que há uma variedade de mecanismos de ação, os quais se encaixam em diferentes tipos e classes de fármacos. Visto isso, temos algumas principais que podemos citar os poliênicos por exemplo, grupo em que está presente a nistatina e a anfotericina B, essa última é considerada um padrão ouro de tratamento antifúngico, atuando na célula alvo ao se ligar ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular (TALAS, 2019).

A cada caso se tem o uso de um fármaco, com o intuito de lidar com o processo patológico, assim temos a maior quantidade de indicações de uma substância, por ter uma atuação melhor contra o determinado microrganismo. No caso dos *Aspergillus spp.* temos a utilização mais frequente dos derivados azólicos como o voriconazol, esse é o triazólico mais recomendado na farmacoterapia contra as infecções causadas por esses fungos (AI, aspergilose pulmonar), pois, possui uma melhor eficácia, além de ter menos efeitos tóxicos que a anfotericina B, assim como as equinocandinas apresentam alta atividade antifúngica (contra aspergilose traqueobrônquica), menor interação medicamentosa e menor suscetibilidade à resistência em comparação aos demais antifúngicos. (PATTERSON et al., 2016; PATIL et al., 2017; TALAS, 2019).

### **3.4 Resistência a antimicrobianos**

O gênero *Aspergillus spp.*, em especial *A. fumigatus* tem uma fácil adaptação a diferentes ambientes e condições, tendo uma propagação bastante rápida. Esse patógeno tem se tornado cada vez mais presente em infecções humanas, devido a sua presença nos locais em que são realizados procedimentos nos quais submetem pacientes a imunossupressão. Quando esse processo patogênico atinge esses indivíduos com imunidade comprometida, é realizado o tratamento com a utilização de antifúngicos, assim após o tratamento prolongado a

medicamentos como os da classe dos azóis esses microrganismos podem apresentar resistência, ou até mesmo a exposição constante ao ambiente contendo esses fármacos (RESENDIZ et al., 2018).

A resistência se dá de formas diferentes podendo ser a apenas um tipo de triazol, a mais de um sendo ele resistente multi-triazol, ou a todos os tipos existentes que seria o tipo pan-triazol. De maneira frequente, há uma mutação nos genes Cyp51A, os fármacos citados atuam quando entram em contato com a enzima Cyp51, o que irá provocar a inibição da biossíntese de ergosterol, pois age inibindo a conversão do lanosterol. Tendo em vista que os genes do tipo Cyp51A sofrem modificações, os sítios de ligação das enzimas também são alterados, o que impede do triazol agir na célula fúngica (RESENDIZ et al., 2018).

### **3.5 O estudo de novas moléculas**

Atualmente os fármacos tem origem natural, biotecnológica ou sintetizados quimicamente, tendo o objetivo de criar substâncias menos tóxicas e mais ativas biologicamente. A química medicinal compreende as etapas da construção de uma nova molécula desde o isolamento das substâncias que tenham resposta ativa, até seu mecanismo de ação, elucidando sua farmacocinética e dinâmica. Para que haja esse desenvolvimento, devem ter estudos pré-clínicos, o que permite a otimização dessas moléculas estudadas para interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (MIKOVSKI et al., 2019).

Mesmo sendo encontradas poucas cepas isoladas, que se mostram resistentes aos antifúngicos presentes no tratamento de *Aspergillus spp.*, futuramente podem surgir um maior número dessas cepas, o que implica em darmos a devida importância aos estudos de novas substâncias, para que haja uma solução contra uma suposta ineficácia dos tratamentos atualmente conhecidos. Por esse motivo a associação de substâncias é essencial para serem encontradas reações sinérgicas, sugerindo novas descobertas de resultados na farmacoterapia antimicrobiana (RAFFETIN et al., 2018). Esses novos medicamentos propostos, devem apresentar um bom perfil farmacocinético, além de amplo espectro de ação antifúngico, diminuindo a periodicidade de dosagens, dispondo de menos efeitos indesejados e interações medicamentosas (SALCI et al., 2018)

### 3.6 Associação de substâncias

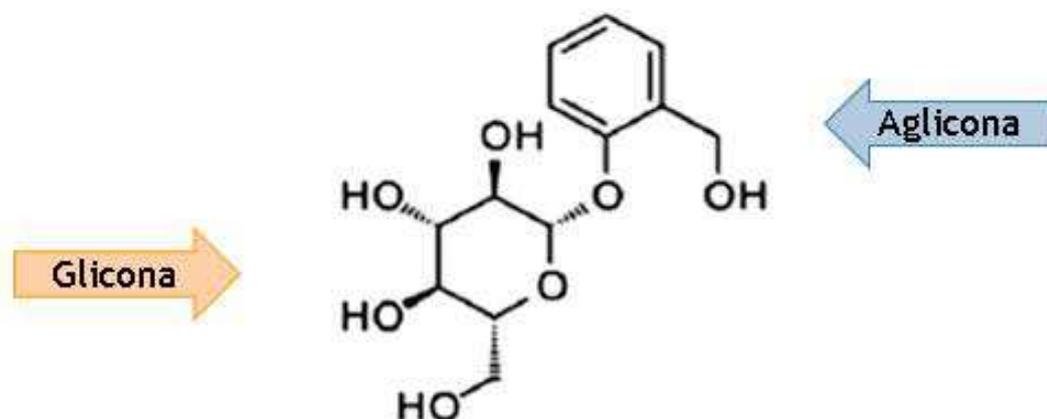
A forma de tratamento mais amplamente utilizada envolve uma intensa terapia com antifúngicos, seguida de um longo período de terapia de manutenção, podendo levar a resistência das cepas tratadas. Apesar de ser o tratamento padrão, existem muitas variações, muitos agentes terapêuticos e durações diferentes, porém alguns deles tem efeitos adversos e um nível de toxicidade considerável, devido as dosagens estabelecidas (MEDEIROS et al., 2018).

Os problemas encontrados nessas terapêuticas levam ao estudo de associação de substâncias, o qual tem o objetivo de minimizar os efeitos adversos e toxicidade por meio da regulação de dosagens, pois, os resultados que são previstos frente a esses testes, são de uma grande eficácia pelo sinergismo entre as substâncias, podendo assim diminuir periodicidade das doses aplicadas aos tratamentos, tendo possíveis reduções na estimativa da farmacoterapia contra as infecções, levando ao aumento da adesão do paciente. Esses experimentos observam a interação farmacodinâmica entre antibióticos usados em combinação, geralmente é investigada através da realização de experimentos através do método de checkerboard, sendo uma abordagem simples que pode ser usada para a triagem rápida de combinações de antibióticos na presença de várias cepas (CHAUZY et al., 2019).

### 3.7 Glicosídeos

Os glicosídeos são compostos orgânicos, que estão presentes em toda a natureza, sendo eles importantes por cumprirem muitas funções diferentes em sistemas biológicos, fornecendo função, estrutura e estabilidade para células e enzimas. Na natureza a síntese de estruturas glicosídicas é realizada pelo grupo de enzimas das glicosiltransferases (HAYES et al., 2017).

Em sua estrutura básica, há uma porção formada por um grupo sacarídeo que é denominada de glicona, e outra porção aglicona, ou seja, um grupo não sacarídeo (SOARES et al., 2018). Os glicosídeos podem ser classificados por exemplo, quando apresentarem-se ligadas pelo mesmo átomo de oxigênio, denomina-se O-glicosídeo, se for por carbono chama-se C-glicosídeo, por nitrogênio N-glicosídeo e por enxofre S-glicosídeo (MATA, 2017). Na figura 1 pode ser observada a estrutura da salicina

**Figura 1** Estrutura da Salicina

Fonte: SHARA; STOHS, 2015

Os carboidratos, representam o grupo mais abundante de compostos encontrados em fontes naturais, estando presentes desde organismos mais complexos, até organismos mais simples. Estes compostos podem realizar ligações especiais, denominadas ligações glicosídicas, e assim conjugar-se com outras moléculas formando os glicosídeos (CAIANA et al., 2020).

Os glicosídeos são um grupo de moléculas que ao longo dos anos estão sendo largamente estudados nas suas mais diversas aplicações (MOURA et al., 2018). Sua síntese química está bem desenvolvida, mas continua sendo uma tarefa trabalhosa, já que muitas etapas de proteção e desproteção seletiva são necessárias para tratar apenas grupos funcionais individuais, a fim de evitar a formação de subprodutos. A síntese de estruturas de glicosídeos, portanto, melhoraria muito a possibilidade de produção de novos produtos farmacêuticos e materiais, e permitiria pesquisas direcionadas sobre propriedades funcionais e estruturais desses compostos (HAYES et al., 2017).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Local de realização

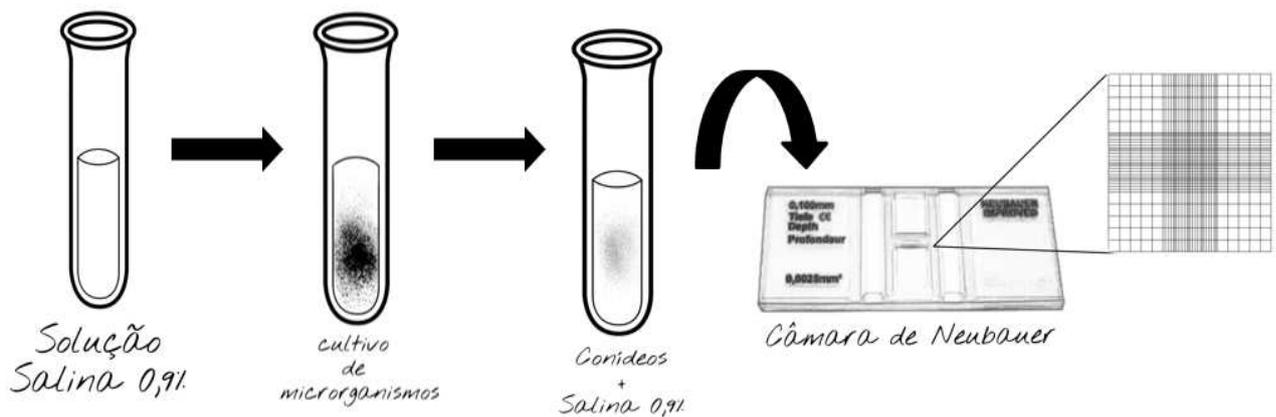
Os testes experimentais foram realizados no laboratório de bioquímica e microbiologia, localizado no bloco J da Universidade Federal de Campina Grande, no Centro de Educação e Saúde, campus Cuité, Paraíba.

### 4.2 Cepas fúngicas e preparação do inóculo

O estudo fez a utilização das seguintes cepas de *Aspergillus* spp.: *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Aspergillus flavus* ATCC 9643.

No experimento realizado para medir os valores de sensibilidade das cepas em relação ao fármaco testado, foi empregado o inóculo. Na preparação introduziu em um tubo com cultivo de microrganismos a salina estéril a 0,9%, depois este foi agitado de forma suave com o intuito de haver a liberação dos conídios. A salina e os conídios foram transferidos para um tubo estéril e uma alíquota foi colocada em uma câmara de Neubauer para que os conídios fossem contados, contendo valores aproximados entre  $1 \times 10^5$  e  $5 \times 10^5$  conídios/mL, podendo ser observado na figura 1.

**Figura 2** Procedimento de preparação do inóculo.



Fonte: Autor do estudo

### 4.3 Substâncias utilizadas

Os métodos desempenhados para o desenvolvimento desse composto, sendo ele um derivado de carboidratos enônicos, foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica (LASO), que está localizado no Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité-PB. O composto que pertence mais especificadamente a classe dos glicosídeos, teve sua sintetização, purificação e caracterização realizada pela Me. Rayane de Oliveira Silva e o Dr. Juliano Carlos Rufino de Oliveira.

Na Central Analítica localizada no campus Recife da Universidade Federal de Pernambuco, foram feitas análises espectrométricas em relação ao composto desenvolvido tendo a utilização de técnicas como Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono, além de rotação específica.

### 4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A solução contendo o carboidrato enônico foi preparada com a utilização do Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% para solubilizar a substância. Os experimentos foram realizados em triplicata e controles Positivo (meio de cultura + fungos) e Negativo (meio de cultura), com DMSO na mesma concentração utilizadas para solubilizar as drogas, foram preparados para demonstrar que o crescimento do microrganismo não sofre influência do DMSO, seguindo o método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute, sendo feitas algumas alterações (CLSI, 2005).

No processo para observar e comprovar *in vitro* a atividade antifúngica contra as cepas selecionadas do gênero *Aspergillus spp.*, foi determinada a CIM através da técnica de microdiluição em caldo, com a utilização do meio de cultura RPMI-1640 em placas estéreis que contém 96 cavidades. Nesse procedimento foram realizados teste em triplicata com diluições seriadas tendo título de 1:2, com a concentração de 1024 µg/mL a 1 µg/mL do composto derivado de carboidratos enônicos, e teve a adição de  $1-5 \times 10^5$  Conídios/mL em cada cavidade. Esse processo pode ser observado na figura 2.

**Figura 3** Método de microdiluição em caldo.



Fonte: Autor do estudo

A incubação do fungo filamentososo foi feita após o preparo da placa, em uma estufa microbiológica configurada com temperatura equivalente a 28°C, por um tempo estimado de 3 a 7 dias visualmente (DI CIACCIO et al., 2020), logo depois a esse período, observou-se o valor da CIM, que corresponde ao resultado de inibição do crescimento microrganismo avaliado visualmente.

#### 4.5 Associação entre as substâncias

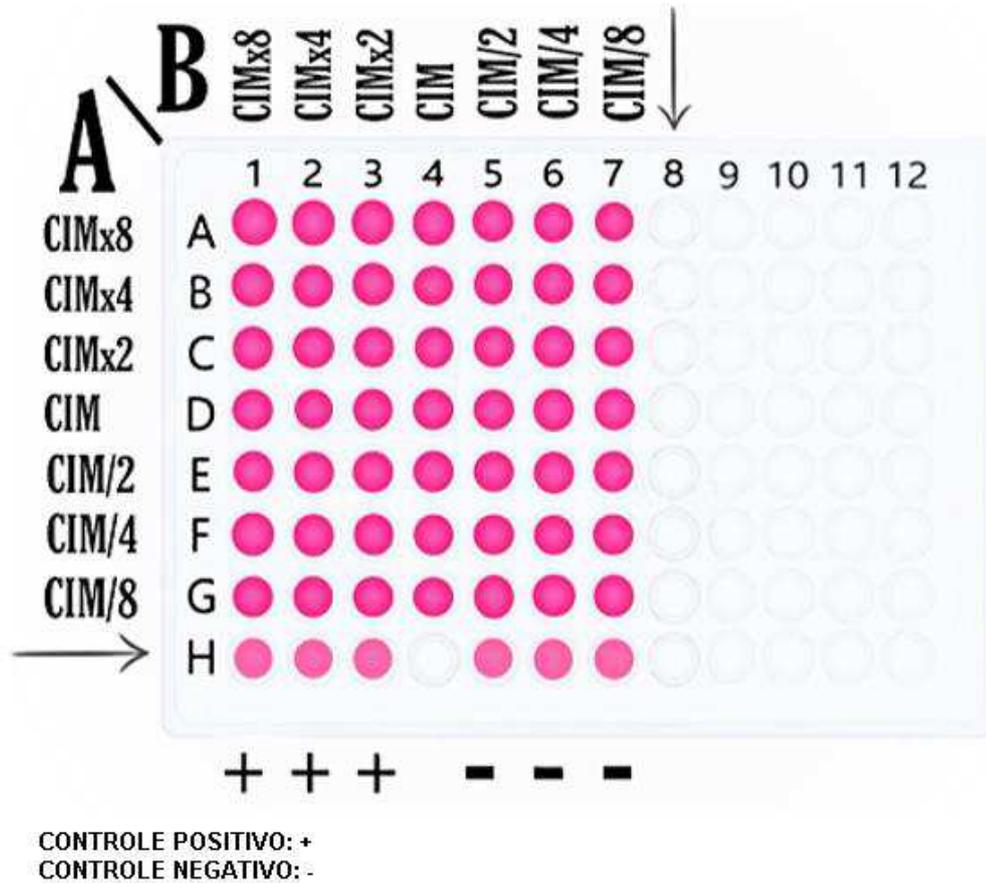
O processo de associação teve como base o procedimento de checkerboard, que determina a concentração inibitória fracionada (ICIF) com o uso das placas estéreis de 96 cavidades. (Ghannoum et al., 2018). Então foram preparados tubos estéreis rotulados para a identificação de suas respectivas concentrações, que corresponderão a CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8.

O preparo da placa, ocorreu através da distribuição das soluções referentes as substâncias, assim tanto o composto derivado dos carboidratos enônicos quanto a anfotericina B, teve uma rotulação como substância “A” e “B” respectivamente.

Em meio ao processo da distribuição dessas substâncias, foi seguido um padrão de acordo com a rotulação, definindo a deposição das concentrações em determinada orientação, sendo depositadas as concentrações horizontalmente de “A” e verticalmente de ”B”. Esse teste

também foi realizado em triplicata. A forma de distribuição das substâncias pode ser observada na figura 3.

**Figura 4** Esquema de distribuição entre os compostos no processo de associação.



Fonte: Autor do estudo

Depois do processo de distribuição das substâncias introduziu-se o inóculo das cepas *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Aspergillus flavus* ATCC 9643, os quais compreendem  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL e foram depositados em todas as cavidades que contém a associação das concentrações das substâncias e nos controles positivos.

Então foi realizada a incubação das placas na estufa microbiológica com a temperatura de 28°C no período estimado de 3 a 7 dias, e depois realizou-se a análise visual para observar o crescimento.

Dessa forma o índice de concentração inibitório fracionado (ICIF) pode ser calculado, essa equação leva em consideração a CIM das substâncias “A”(carboidrato enônico) e “B” (anfotericina B), isoladas e em combinação na associação, fazendo com que o valor da CIM da associação da substancia A, seja dividida por sua CIM isolada e dessa mesma forma teve aplicação a “B”, resultando nos valores de CIF de “A” e de “B”. quando encontrado os valores da CIF das duas substâncias, esses valores foram somados para que fossem definido o valor da ICIF.

**Figura 5** Esquema do cálculo para determinação de ICIF.

$$\text{ICIF} = (\text{CIM}_A \text{ COMB. B} \div \text{CIM}_A) + (\text{CIM}_B \text{ COMB. A} \div \text{CIM}_B)$$

Esse valor tem sua classificação de acordo com a sua efetividade no processo de associação, o que determina se o sinergismo entre os dois compostos é existente. A associação pode ser classificada como sinérgica ( $\text{ICIF} \leq 0,5$ ), como aditiva ( $\text{ICIF} > 0,5$  e  $< 1,0$ ), indiferente (1 a 4) ou antagônica ( $\geq 4$ ) (DOERN, 2014).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Concentração inibitória mínima

Com o surgimento de cada vez mais casos atrelados à resistência em relação aos antifúngicos, impacta de forma negativa a população afetada por infecções fúngicas, o que faz pesquisadores realizarem buscas por novas substâncias que mostrem um potencial de ação relevante contra cepas (DELLIÈRE et al., 2020).

Tendo isso em vista, são feitos estudos voltados para a extração a partir da pesquisa em plantas medicinais e síntese de compostos, obtendo novas estruturas podendo ser promissoras na utilização terapêutica.

Os resultados analisados, mostram que o derivado de Carboidrato enônico, apresenta valores de CIM semelhantes contra *Aspergillus flavus* ATCC 9643 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913. A tabela 1 evidencia, que os resultados obtidos a partir do composto sintético são significativos por sua ação inibitória.

**Tabela 1** valores da CIM\* em µg/mL das substâncias testadas contra *Aspergillus spp.*

<b>Cepas</b>	<b>Carboidrato enônico</b>	<b>Anfotericina B</b>
<i>A. flavus</i> ATCC 9643	<b>64</b>	<b>0,25</b>
<i>A. fumigatus</i> ATCC 16913	<b>64</b>	<b>0,25</b>

**Fonte:** Dados da pesquisa

\* Concentração inibitória mínima.

Em estudos desempenhados por El Malah e colaboradores, que sintetizaram novas substâncias a partir do 1,2,3-triazol glicosídeos, as quais dentre estas, através do método de CIM conseguiram inibir o crescimento de microrganismos testados como do gênero *Aspergillus spp.* (EL MALAH et al., 2020).

Em um estudo anterior foram realizados testes com a utilização do extrato de plantas medicinais que continham substâncias ativas como glicosídeos em sua composição. as espécies *O. gratissimum* e *C. volubile*, obtiveram efeitos fungicidas contra *A. flavus* e efeitos fungistático quando testada a *M. oleífera* (AGBOOLA; AWE, 2016).

Kim e colaboradores, conseguiram obter glicosídeos triterpenos do tipo oleanano e ursano a partir da extração da *Trevesia palmata*, cuja a maioria dessas substâncias resultaram

em atividade antifúngica, inibindo completamente o crescimento dos microrganismos fitopatogênicos *in vitro* com até 125 µg/mL (KIM et al., 2018).

Os testes feitos a partir da extração de glicosídeos flavonoides da *Ginko biloba*, resultaram em uma boa atividade antimicrobiana, tendo um potencial um pouco maior na utilização em conjunto das substâncias atuando de forma sinérgica, embora que de maneira individual, os compostos extraídos quercetina, kaempfirol e isorannetina obtiveram valores expressivos de CIM (SATI et al., 2019).

Estudos realizados por Tagousop e colaboradores buscaram testar a atividade antimicrobiana de glicosídeos flavonoides oriundos de *Graptophyllum grandulosum*, no qual pode concluir a eficácias dessas substancias a partir dos testes. Alguns resultados inclusive dentre os valores em µg/mL foram semelhantes aos do presente estudo, o que mostra a relevância do potencial biológico voltada ao composto neste testado. Sendo considerados significativamente ativos os compostos que inibiram o crescimento das cepas testadas e apresentaram valores abaixo de 100 µg/mL (TAGOUSOP et al., 2018).

## 5.2 Associação entre as substâncias testadas

Com o surgimento de resistência aos azóis pelo gênero *Aspegillus spp.*, fez com que nessas circunstâncias fosse recomendada a terapia combinada entre substâncias, as colocando como um tratamento de primeira linha nesses casos (KULLBERG et al., 2017).

A anfotericina B por exemplo, tem seu uso na forma lipídica por ter menor toxicidade, e é utilizado também no tratamento contra a aspergilose quando refrataria no uso dos azóis, porém pode haver resistência mesmo que de maneira rara contra *Aspegillus fumigatus* e mais frequente quando relacionado a espécie *Aspegillus flavus* (SPANAMBERG et al., 2020).

A combinação de antifúngicos é uma estratégia terapêutica que pode ser benéfica quando as interações medicamentosas são sinérgicas, bem como nos casos de infecção por organismo resistente. Por esse motivo, quando o tratamento convencional não demonstrar o resultado esperado, é um dos principais agravantes que levam aos pesquisadores procurarem essas combinações na busca de eficácia terapêutica (RAFFETIN et al., 2018).

O estudo voltado para a associação entre o carboidrato enônico e a anfotericina B realizado com o ensaio padrão de microdiluição em *checkerboard*, demonstrou a diferença significativa entre os resultados encontrados quando combinados (substâncias A e B), em

relação a CIM de cada substância agindo de maneira individual contra as cepas de *Aspergillus spp.*, podendo ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2** Associação entre o carboidrato enônico (A) e a anfotericina B (B).

Cepas	CIF* do Carb. Enônico	CIF da anfotericina B	ICIF**	Interpretação
<i>A. flavus ATCC 9643</i>	8	8	>4	Antagonista
<i>A. fumigatus ATCC 16913</i>	8	8	>4	Antagonista

**Fonte:** Dados da pesquisa

\*Concentração Inibitória Fracionado (CIF);

\*\* Índice de Concentração Inibitória Fracionado (ICIF).

Foi constatado o crescimento simultâneo do microrganismo em todas as cavidades testadas da placa, a não ser obviamente o controle negativo. Isso demonstra que as substâncias agiram de forma antagonista entre si, já que o valor resultante da ICIF, é considerado como >4.

Em um estudo semelhante, GUERRA e colaboradores associaram um composto derivado cumarínico a anfotericina B e azóis, os quais foram testados contra as cepas de *A. flavus ATCC 16013* e *A. fumigatus ATCC 46913*. Nos testes obtiveram os resultados que apontam sinergismo na combinação de Cou-UMB16 com voriconazol contra *A. flavus ATCC 16013* e aditiva contra *A. fumigatus ATCC 46913*, já a anfotericina B em associação ao novo composto se mostrou indiferente contra todas as cepas testadas (GUERRA et al., 2018).

Pesquisas anteriores mostram que buscaram o efeito antimicrobiano entre a combinação de citral com a anfotericina B, constatou o antagonismo entre esses compostos, já com relação ao voriconazol se mostrou indiferente (CALDAS, 2017).

A parede celular tem grande importância para o estudo de resistência, pois pode ser relacionada a sua dinâmica a sobrevivência de microrganismos. Em alguns casos são desenvolvidas alterações pela mudança da composição dessas paredes, como em cepas de *Aspergillus flavus* com uma maior quantidade de  $\beta$ -D-glucano, sendo estas resistentes a anfotericina B (LIMA et al., 2019).

No estudo de Ghannoum et al. (2018), foi feita a associação entre um novo composto glicosídeo triptenóide semissintético, o ibrexafungerp (SCY-078) e a anfotericina B também utilizando o método em *checkerboard*. Mostrou em seus resultados que não havia a interação entre a ação dessas substâncias contra cepas de *Aspergillus fumigatus* resistentes a azóis o que

as apontavam nesse caso serem antagonistas (>4), porém em cepas mutantes *cyp51* demonstraram sua sinergia. Em casos como esse, pode ser evidenciado a possibilidade de haver um resultado diferente utilizando a mesma combinação.

Com a atividade apresentada neste trabalho, pelo composto derivado de carboidrato enônico contra as cepas do gênero *Aspergillus spp.*, fica a alternativa para o desenvolvimento de novos estudos ou modificações, em relação ao composto testado, para que se busque o aperfeiçoamento de seus efeitos contra microrganismos fúngicos ou bacterianos.

## 6. CONCLUSÃO

Concluiu-se neste estudo a eficácia de potencial biológico voltado para o composto testado, o derivado de carboidrato enônico. Com uma concentração inibitória mínima igual a 64µg/mL, mostrou-se um ativo promissor na atividade antifúngica, e em associação a anfotericina B, foi visto o antagonismo entre as substâncias contra as cepas de *Aspergillus spp.*, o que leva a considerar que devido a sua relevância de maneira individual, o derivado carboidrato enônico, pode ser estudado para que haja um melhoramento através da modificação da molécula, gerando um possível aumento em seu espectro de ação e compatibilidade sinérgica com outras substâncias. Assim aumentando a expectativa do surgimento de novas pesquisas de fármacos recém-sintetizados, tendo em vista que cada vez mais a associação de substâncias possam vir a incentivar o aprimoramento de novos métodos para a eficácia no desaparecimento de enfermidades causadas por microrganismos patógenos, podendo ser tanto de origem fúngica quanto bacteriana.

## REFERÊNCIAS

1. AMICH, Jorge et al. Three-dimensional light sheet fluorescence microscopy of lungs to dissect local host immune-*Aspergillus fumigatus* interactions. **Mbio**, v. 11, n. 1, 2020.
2. BENEDICT, K.; RICHARDSON, M.; VALLABHANENI, S.; JACKSON, B. R.; CHILLER, T. Questões emergentes, desafios e mudanças na epidemiologia dos surtos de doenças fúngicas. **Revista A Lanceta**, v. 17, n. 12, p. 403-411, Dez. 2017.
3. BENEDICT, Kaitlin et al. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 11, p. 1791-1797, 2019.
4. BONGOMIN, Felix et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
5. CAIANA, Rodrigo Ribeiro Alves et al. Síntese e bioensaio toxicológico frente às larvas de artemia salina do nPROPIL 4, 6-DI-O-Acetil-2, 3-Didesoxi- $\alpha$ -D-Eritro-Hex-2-Enopiranosídeo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55512-55519, 2020.
6. CALDAS, Camila Pinheiro de Menezes et al. Investigação do mecanismo da atividade antifúngica do monoterpreno citral frente a cepas de *cladosporium* spp e *cladophialophora carrionii*. 2017.
7. CALUMBY, Rodrigo Jose Nunes et al. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em Unidade de Terapia Intensiva/Isolation and identification of anemophilic fungal microbiota in an Intensive Care Unit. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19708-19722, 2019.
8. CHAUZY, Alexia et al. Pharmacodynamic modelling of  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor checkerboard data: illustration with aztreonam–avibactam. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 4, p. 515. e1-515. e4, 2019.
9. DELLIÈRE, S. et al. Comparison of the MICs Obtained by Gradient Concentration Strip and EUCAST Methods for Four Azole Drugs and Amphotericin B against Azole-Susceptible and-Resistant *Aspergillus Section Fumigati* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 3, 2020
10. DI CIACCIO, Lucía S. et al. In Vitro Antifungal Activity of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. extracts against *Aspergillus flavus*. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 438, 2020.
11. DONNELLY, J. Peter et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. **Clinical Infectious Diseases**, 2019.
12. EL MALAH, Tamer et al. Design, synthesis, and antimicrobial activities of 1, 2, 3-triazole glycoside clickamers. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 790, 2020.
13. EL MALAH, Tamer et al. Design, synthesis, and antimicrobial activities of 1, 2, 3-triazole glycoside clickamers. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 790, 2020.

14. ENGEL, Tobias GP et al. Aerosol transmission of *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients in the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 797, 2019.
15. FISHER, Matthew C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018.
16. FOLI MAIOLI COSTA, E.; ANDRADE, L. A importância da atuação podológica na prevenção e tratamento de infecções fúngicas em idosos. **REVISTA IBERO-AMERICANA DE PODOLOGIA**, v. 1, n. 1, p. 01 - 12, 20 ago. 2019.
17. GHANNOUM, M. et al. Evaluation of the antifungal activity of the novel oral glucan synthase inhibitor SCY-078, singly and in combination, for the treatment of invasive aspergillosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, 2018.
18. GUERRA, Felipe QS et al. A new coumarin derivative, 4-acetatecoumarin, with antifungal activity and association study against *Aspergillus* spp. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 2, p. 407-413, 2018.
19. HAYES, Marc R.; PIETRUSZKA, Jörg. Synthesis of glycosides by glycosynthases. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1434, 2017.
20. Jeff-Agboola, YA; AWE, LB Triagem antifúngica e fitoquímica de alguns extratos de plantas medicinais da Nigéria contra o *Aspergillus flavus* toxigênico. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1210556, 2016.
21. KIM, Bora et al. Identification of novel compounds, oleanane-and ursane-type triterpene glycosides, from *Trevesia palmata*: Their biocontrol activity against phytopathogenic fungi. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
22. KULLBERG, B. J. et al. SWAB guidelines for the management of invasive fungal infections. **Dutch Working Party on Antibiotic Policy. Available online at: <https://swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/3AA7A56CE879587BC12581F80061297F/\protect>**, v. 1, 2017.
23. LEWIS, Mary et al. Biocontrol strains differentially shift the genetic structure of indigenous soil populations of *Aspergillus flavus*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1738, 2019.
24. LIMA, B. Anfotericina B pré-aquecida: avaliação da atividade frente a isolados clínicos de *Candida* spp. do HU-UFSC. 2017. 72f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.
25. LIMA, Soraia L.; COLOMBO, Arnaldo L.; DE ALMEIDA JUNIOR, João N. Fungal cell wall: emerging antifungals and drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
26. MATA, Mauricélia Maria de Sousa. 1, 2, 4-oxadiazóis e O e S-glicosídeos-2, 3-insaturados: síntese e caracterização estrutural. 2017. 94 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, 2017.

27. MEDEIROS, Cássio Ilan Soares et al. Atividade anti-Candida tropicalis dos enantiômeros (R)-(+)-& (S)-(-)-citronelal em associação com nistatina. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 7, n. 1, 2018.
28. MENG, Guangxun; LI, Zhi; LU, Gen. Pathogenic fungal infection in the lung. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1524, 2019.
29. MIGOTT, Gustavo Bellani et al. Clinical and Epidemiological Profile of Patients with Suspected Pulmonary Aspergillosis of a Hospital on Rio Grande do Sulstate, Brazil. **Journal of Epidemiology and Infection Control**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 34-39, jan. 2017. ISSN 2238-3360.
30. MIKOVSKI, Daniele et al. Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 13, p. 29-43, 2019.
31. MOURA, Aldiceia Luiz de et al. O-glicosídeos 2,3-insaturados: aplicações, rearranjo de ferrier e reações. *Química Nova*, v. XY, n. 0, p. 1-17, fev, 2018.
32. NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma Aprovada, M38-A Vol. 22 No. 16 Substitui a Norma M38-P Vol. 18 No. 3. 2002.
33. PATIL, Akash; MAJUMDAR, Soumyajit. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1635-1660, 2017.
34. PATTERSON, Thomas F. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. e1-e60, 2016.
35. PAULUSSEN, Caroline et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.
36. PILANIYA, Vikas et al. Aspergilose pulmonar invasiva aguda, logo após exposição ocupacional a água poluída barrenta, em indivíduo previamente saudável. **J. bras. pneumol.**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 473-477, Oct. 2015.
37. RAFFETIN, A. et al. In Vitro Combination of Isavuconazole with Echinocandins against Azole-Susceptible and-Resistant *Aspergillus* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01382-17, 2018.
38. RAFFETIN, A. et al. In Vitro Combination of Isavuconazole with Echinocandins against Azole-Susceptible and-Resistant *Aspergillus* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, 2018.
39. RESENDIZ SHARPE, Agustin et al. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. **Medical mycology**, v. 56, n. suppl\_1, p. S83-S92, 2018.
40. RUDRAMURTHY, Shivaprakash M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 55, 2019.

41. SALCI, T. P.; NEGRI, M.; ABADIO, A. K. R.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, E. S. Segmentação *Candida* spp. para desenvolver agentes antifúngicos. *Revista Descoberta de Drogas Hoje*, v. 23, Ed. 4, p. 802-814, Abr. 2018.
42. SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. ***Studies in mycology***, v. 78, p. 141-173, 2014.
43. SATI, Priyanka et al. Ginkgo biloba flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method. ***Journal of traditional and complementary medicine***, v. 9, n. 1, p. 15-23, 2019.
44. SCHWARTZ, Ilan S. et al. High rates of influenza-associated invasive pulmonary aspergillosis may not be universal: a retrospective cohort study from Alberta, Canada. ***Clinical Infectious Diseases***, 2020.
45. SEWELL, Thomas R. et al. Elevated Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Urban versus Rural Environments in the United Kingdom. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 63, n. 9, p. e00548-19, 2019.
46. SOARES, Gustavo Lima et al. Síntese e avaliação do prop-2-in-1-il 4, 6-di-O-acetil-2, 3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo contra espécies não albicans de *Candida* e resultados da associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol. ***Revista Pan-Amazônica de Saúde***, v. 9, n. 2, p. 8-8, 2018.
47. SPANAMBERG, Andréia et al. Antifungal susceptibility profile of *Aspergillus fumigatus* isolates from avian lungs. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 40, n. 2, p. 102-106, 2020.
48. TAGOUSOP, Cyrille Ngoufack et al. Atividades antimicrobianas de glicosídeos flavonóides de *Graptophyllum grandulosum* e seu mecanismo de ação antibacteriana. ***BMC medicina complementar e alternativa***, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.
49. TALAS, L.; SZIGETI, Z. M.; BANFALVI, G.; SZEMAN-NAGY, G. Efeito da anfotericina B e do voriconazol sobre o crescimento de conídios de *Aspergillus fumigatus* seguido de microscopia de lapso de tempo. *Revista AMB Express*, v. 9, n. 43, p. 1-8, Abr. 2019.
50. VERÍSSIMO, Cristina et al. Etiologia das infecções fúngicas invasivas e subcutâneas: análise dos dados da Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infecções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFIs), 2013-2018. 2019.
51. ZAITZ, Clarisse et al. ***Compêndio de Micologia Médica***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2010. 456 p.