

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

GUSTAVO LIMA SOARES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM O-GLICOSÍDEO 2,3-INSATURADO

CUITÉ

2018

GUSTAVO LIMA SOARES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM O-GLICOSÍDEO 2,3-INSATURADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Unidade Acadêmica de Saúde do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento do pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

CUITÉ

2018

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

S676a Soares, Gustavo Lima.

Atividade antifúngica de um O-glicosídeo 2,3-insaturado./
Gustavo Lima Soares. – Cuité: CES, 2018.

36 fl.

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

Orientador: Dr^o. Wylly Araújo de Oliveira

1. glicosídeo. 2. *Candida*. 3. antifúngicos. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.1

Fixa de aprovação

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus.

Dedico e agradeço 100% desse trabalho e minha formação a minha irmã Maria José, por ser a principal incentivadora do início ao término da minha graduação, e por sempre ter me apoiado, ouvido, orientado, por existir em minha vida e por ser minha segunda mãe. Agradeço também a minha irmã Silmara que tanto me ajudou, a minha mãe, ao meu avô José Borges por ter acreditado em mim, me incentivado e cuidado como seu filho e aos demais familiares que sempre me apoiaram.

Agradeço aos amigos que sempre me apoiaram e contribuíram direta ou indiretamente para conclusão do curso, em especial Leonardo Costa que muito me ajudou. Sou grato a Jefferson Rodrigues e Paula Mariane por repassarem a metodologia para a condução dos experimentos e a todos os professores dos quais fui aluno durante o curso.

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano por ceder o composto e por todas as orientações durante o curso.

Por fim agradeço grandemente ao meu orientador Prof. Dr. Wylly Oliveira, por tudo que fez por mim e por toda sua paciência, ensinamentos, broncas e conversas.

Espero um dia poder retribuir a todos a altura.

Obrigado por tudo!

“O homem é do tamanho do seu sonho”
(Fernando Pessoa)

RESUMO

As infecções por *Candida* causam altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente pelo aumento da resistência microbiana, fato que dificulta o tratamento das diversas formas de manifestações clínicas apresentadas por esse micro-organismo. As limitações dos agentes antifúngicos convencionais levam a pesquisas por novos antifúngicos ou associações de substâncias antimicóticas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antifúngica de um O-glicosídeo 2,3-insaturado contra *Candida não-albicans* e sua combinação com anfotericina B ou cetoconazol. O teste da atividade antifúngica foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, e a associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol pelo método do checkerboard. Como resultado foi observado que o composto não foi capaz de inibir o crescimento fúngico, porém apresentou atividade sinérgica em associação com a anfotericina B e indiferente com o cetoconazol. Conclui-se que não é viável a utilização isolada do glicosídeo como antifúngico, entretanto sua utilização em combinação com anfotericina B pode ser uma alternativa terapêutica, sendo necessária a realização de estudos aprofundados acerca dessa combinação.

Palavras-chave: *Candida*, glicosídeo, associação, antifúngicos.

ABSTRACT

Candida infections cause high rates of morbidity and mortality, especially by the increase of the microbial resistance, fact that makes difficult the treatment of the diverse forms of clinical manifestations presented by this microorganism. The limitations of conventional antifungal agents lead to research for new antifungal or combinations of antifungal substances. The objective of this study was to evaluate the antifungal action of a 2,3-unsaturated O-glycoside against *Candida non-albicans* and its combination with amphotericin B or ketoconazole. The antifungal activity test was performed by the broth microdilution method and the association with amphotericin B or ketoconazole by the checkerboard method. As a result it was observed that the compound was not able to inhibit fungal growth, but showed synergistic activity in association with amphotericin B and indifferent with ketoconazole. It concludes that an isolated use of the glycoside as an antifungal is not feasible, however its use in combination with amphotericin B may be a therapeutic alternative, and it is necessary to carry out in-depth studies on this combination.

Key-words: *Candida*, glycoside, association, antifungals.

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1 - Cepas de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> em Agar Sabouraud Dextrose.....	15
Figura 2 - Sequência de testes para pesquisa por novos antifúngicos.	22
Figura 3 - Estrutura do O-glicosídeo 2,3-insaturado.	25
Figura 4 - Placa da associação entre o glicosídeo e a anfotericina B.	30
Figura 5 - Placa da associação entre o glicosídeo e o cetoconazol.....	30

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 - Valores das CIMs do glicosídeo, da anfotericina B e do cetoconazol, frentes as cepas de <i>Candida não-albicans</i>	28
Tabela 2 - Associação entre o glicosídeo e os antifúngicos contra <i>C. tropicalis</i> ATCC-13803.	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KOH	Hidróxido de Potássio
LM	Laboratório de Micologia
mL	Mililitro
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µg	Micrograma
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 <i>Candida</i>: características e infecções	15
3.2 Fatores de virulência	16
3.3 Diagnóstico	17
3.4 Resistência	18
3.4.1 Resistência aos poliênicos	19
3.4.2 Resistência aos azóis	19
3.5 Tratamento	19
3.6 Novos antifúngicos	21
3.7 Associações	22
3.8 Glicosídeos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Local de trabalho	25
4.2 O-glicosídeo 2,3-insaturado	25
4.3 Espécies fúngicas utilizadas	25
4.4 Preparo do inóculo	26
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
4.6 Associação das substâncias	26
4.7 Determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Infecções provocadas por *Candida* estão entre os problemas de saúde mais frequentes, ocasionando uma expressiva taxa de morbidade e mortalidade. *Candida albicans* é a principal causadora de infecções, porém espécies não-*albicans* vem acarretando um elevado número de infecções (LOCKHART, 2014).

Espécies de *Candida* são comumente encontradas colonizando de forma comensal homens e animais, estando presente em diversos sítios do corpo, como mucosas do trato gastrointestinal, boca, vagina e pele. Espécies foram encontradas nos mais diversos ambientes como ar, água e solo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Segundo os autores supracitados, as infecções provocadas por *Candida* englobam casos de doenças superficiais e invasivas, sobretudo quando ocorre o acometimento de pacientes expostos a diversos fatores de riscos. Infecções de pele e unhas, mucosas, candidíase vaginal, candidemias, endocardite, pneumonia, infecção ocular e infecção no sistema nervoso central são exemplos de complicações causadas por espécies de *Candida*.

Durante a evolução da infecção por *Candida*, a levedura atua expressando diversos fatores de virulência, os quais levam a uma elevada patogenicidade nos tecidos acometidos do hospedeiro (GONÇALVES et al., 2016). Os fatores de virulência além de facilitarem a instalação e o desenvolvimento da infecção também atuam dificultando a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, aumentando a eficiência da infecção (SANTANA et al., 2013).

A constante utilização de agentes antifúngicos tem despertado preocupações devido à seleção de cepas resistentes. Estudos têm relatado uma alta incidência de infecções ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* resistentes aos fármacos de primeira e segunda escolha, como é o caso dos derivados azólicos, que atualmente estão entre os mais prescritos para o tratamento de candidíase (SAHU; GANGULY; KAUSHIK, 2013; SRINIVASAN; OPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Em um cenário no qual o número de relatos do surgimento de resistência aos tratamentos com antifúngicos convencionais é maior que a quantidade de novas moléculas com atividade antifúngica, existe uma forte alternativa terapêutica contra essas infecções: a associação de substâncias antifúngicas. Tal alternativa vem sendo relatada com diversos benefícios da sua utilização quando confrontados seus resultados aos da monoterapia, incluindo os casos de infecções resistentes (CAMPITELLI et al., 2017).

A pesquisa por novos compostos potencialmente ativos biologicamente vem sendo considerada como uma importante alternativa terapêutica, trazendo a possibilidade de se explorar alvos terapêuticos distintos dos existentes assim como propor novas possibilidades de ação sobre alvos terapêuticos conhecidos (FUENTEFRÍA et al., 2016). Um número expressivo de agentes com atividades biológicas foram obtidos através das técnicas empregadas na síntese orgânica (LIMA et al., 2006), como é o caso dos glicosídeos (BAKER et al., 2016; CHEN et al., 2016; EISSA et al., 2016).

Os glicosídeos são um grupo de moléculas com um grande potencial farmacológico, apresentando diversas atividades biológicas. Algumas moléculas glicosídicas foram descritas com potencial de atividade antibacteriana (QIAO et al., 2016; BRAHIMI; BELKADI; OTHMAN, 2017), anti-inflamatória (MOURA et al., 2018), antioxidante (IWADATE et al., 2014), antitumoral (MOURA et al., 2018) e atividade antifúngica (KHAN et al. 2017).

Considerando a notável necessidade da descoberta de novas moléculas com alto potencial antifúngico e a vasta capacidade de atuação dos glicosídeos, a avaliação da atividade antifúngica do O-glicosídeo 2,3-insaturado realizada no presente estudo é de grande relevância para a busca por novas alternativas para o tratamento de infecções por *Candida*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a ação antifúngica do prop-2-in-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (O-Glicosídeo 2,3-insaturado) contra espécies de *Candida não-albicans*, assim como avaliar sua atividade antimicrobiana quando associado com anfotericina B ou com cetoconazol.

2.2 Específicos

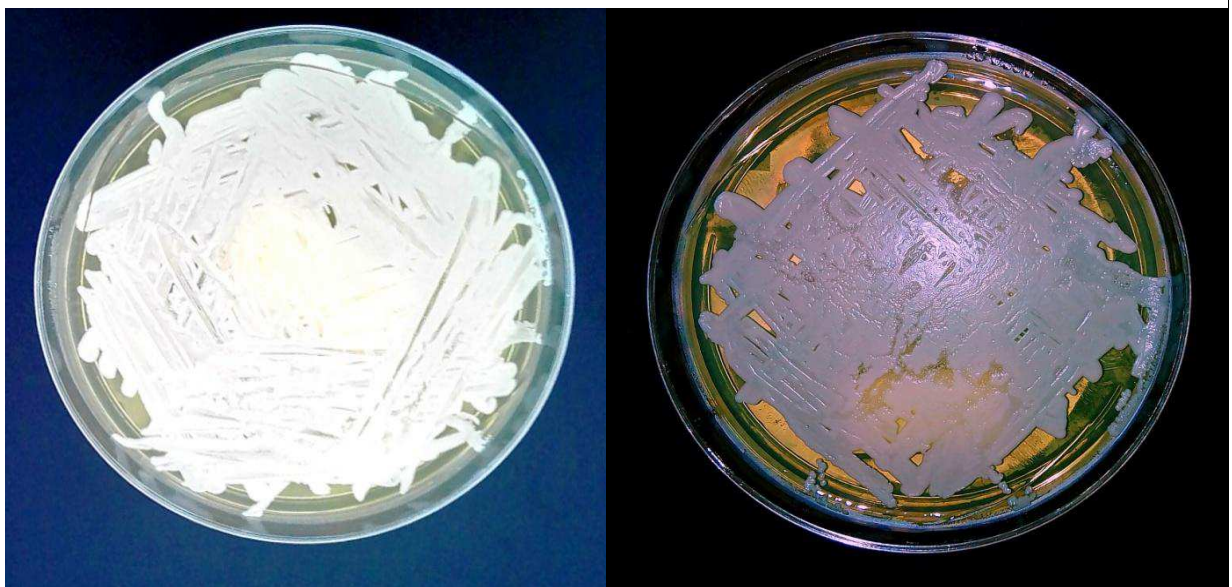
- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do O-glicosídeo 2,3-insaturado contra espécies de *Candida não-albicans*;
- determinar a CIM da anfotericina B e do cetoconazol contra espécies de *Candida não-albicans*;
- determinar o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação do O-glicosídeo 2,3-insaturado com a anfotericina B e;
- determinar o ICIF da associação do O-glicosídeo 2,3-insaturado com o cetoconazol.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Candida*: características e infecções

O gênero *Candida* é composto por uma ampla gama de espécies que se apresentam sob a forma de leveduras ovaladas, que formam brotamentos. São capazes de produzir hifas verdadeiras e/ou pseudohifas. Em culturas apresentam-se geralmente como colônias brancas, lisas e convexas (Figura 1), porém diversas espécies podem sofrer alterações para colônias “cabeludas” formadas principalmente por hifas ou pseudohifas. Tais modificações fenotípicas são atribuídas como ferramenta de sobrevivência em resposta a estímulos do ambiente local (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Figura 1 - Cepas de *Candida* não-*albicans* em Agar Sabouraud Dextrose.



Fonte: Dados da pesquisa.

As mulheres, em sua maioria, foram ou serão colonizadas na vaginal por *Candida* em algum momento da vida. Comumente a colonização por *Candida* é assintomática, porém pode causar manifestações clínicas quando ocorrem desequilíbrios entre a colonização e o ambiente do portador. Alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da candidíase, tais como gravidez, reposição hormonal, diabetes descontrolada, imunossupressão, uso de antibióticos, terapia com glicocorticóides e predisposição genética. Os casos mais graves de infecções sistêmicas geralmente são pacientes imunocomprometidos (GONÇALVES et al., 2016).

A candidíase oral é uma infecção comumente relatada em pacientes com uso de prótese dentária ou imunodeficientes. As lesões causadas por essa infecção na mucosa oral podem estar relacionadas com o maior risco ao desenvolvimento de distúrbios potencialmente malignos (SANKARI et al., 2015; CASTILLO et al., 2018)

A infecção da corrente sanguínea causada por *Candida*, candidemia, é uma das infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo, estando relacionada a altos custos nos tratamentos e altos índices de mortalidade (TREVINO-RANGEL et al., 2017).

Apesar de escassos, casos de meningite ocasionados por *Candida* vêm sendo relatados. O prognóstico e definição da terapia adequada são dificultados devido à raridade da notificação desses casos. O risco para desenvolver o quadro de meningite por *Candida* é pouco conhecido, sendo principalmente causada em pacientes imunodeprimidos, em uso de antibióticos de amplo espectro, com candidíase disseminada, em nutrição parenteral, neonatos prematuros ou pacientes com neurocirurgia (GOLDANI; SANTOS, 2010).

Candida albicans é a espécie mais frequentemente relatada como causa dos casos de infecção. Entretanto a frequência dos episódios de infecções acarretadas por espécies não-*albicans* vem aumentando progressivamente. Dentre as cepas não-*albicans* isoladas dos sítios de lesão pode-se citar *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* (GUINEA, 2014; HALL et al., 2017), *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida sake* e *Candida kefyr* (SAV et al., 2018).

3.2 Fatores de virulência

O gênero apresenta diversos fatores de virulência, podendo-se destacar a produção de enzimas extracelulares, a síntese de hemolisinas, a capacidade de adesão, a formação de biofilme, mudança fenotípica e formação de hifas (GONÇALVES et al., 2016) . O estudo desses fatores de virulência tem grande relevância clínica, uma vez que o seu conhecimento pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias eficientes para os tratamentos de infecções fúngicas (CASTILLO et al., 2018).

O processo infeccioso tem seu surgimento na adesão das células fúngicas. O micro-organismo expressa moléculas que irão facilitar a adesão aos tecidos do hospedeiro, denominadas adesinas. A adesão do fungo irá proporcionar sua fixação ao hospedeiro e a partir dessa fixação iniciam-se os processos subsequentes da colonização. O processo de adesão é influenciado por diversos fatores, tais como a formação do biofilme, condições

propícias ao crescimento e produção de enzimas extracelulares (SANTANA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016).

Durante a infecção as principais enzimas secretadas são fosfolipases e proteinases, as quais atuam causando danos as células do hospedeiro e facilitando a invasão do fungo (SANTANA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016). É provável que ocorra uma sinergia na atuação de exoenzimas liberadas por *Candida*, gerando uma hidrólise de lipídios que libera ácidos graxos utilizados como fonte de carbono para o fungo e causam uma redução do pH, o que favorece a atividade das proteinases (CASTILLO et al., 2018).

A formação do biofilme é um dos fatores mais conhecidos produzidos por *Candida*, sendo relatada alta resistência aos tratamentos com antifúngicos e maior gravidade na evolução clínica do paciente quando comparada a infecções acometidas por cepas não formadoras de biofilme (TREVINO-RANGEL et al., 2017).

A variação de forma leveduriforme para forma filamentosa ou formação de pseudohifas é um importante mecanismo de invasão utilizado por diversas espécies de *Candida*. A formação de hifas além de conferir uma maior capacidade de invasão aos tecidos também dificulta a fagocitose pelo sistema imunológico do paciente (SANTANA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016).

3.3 Diagnóstico

O diagnóstico das infecções fúngicas segue um desafio para patologistas e clínicos devido à complexidade dos pacientes em risco e uma alta predisposição de fungos que podem infectar esses pacientes. Uma abordagem multidisciplinar oferece maiores subsídios para o diagnóstico e tratamento bem-sucedidos. Para um rápido diagnóstico é necessário que se tenha uma elevada suspeita clínica e conhecimento dos fatores de risco predisponentes dessas infecções. A falta de um quadro clínico específico para determinada infecção fúngica dificulta em muito o diagnóstico da infecção e do agente etiológico, tornando o diagnóstico dependente de três abordagens laboratoriais; microbiológica, histopatológica e imunológica. A identificação de antígenos fúngicos é uma esperança para o diagnóstico rápido de tais infecções (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

O diagnóstico laboratorial da candidíase é baseado na obtenção do material clínico, que pode ser submetido a exames a fresco e/ou cultura. A cultura de espécies de *Candida* em meios cromogênicos seletivos, como o meio CHROMagar *Candida*, possibilita a identificação da espécie através da diferente coloração nos meios seletivos que há entre as diferentes cepas.

Em meio CHROMagar *Candida* estirpes de *Candida albicans* forma colônias esverdeadas, *Candida tropicalis* forma colônias azul-acinzentadas e *Candida krusei* forma colônias largas, rugosas e de coloração rosa-pálida. Exames de raspados das lesões podem ser examinados diretamente em hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou a 20%, contendo calcoflúor branco. Os cortes histológicos devem ser corados com Prata Metenamina de Gomori ou coloração específica para fungo. A presença de leveduras com brotamento ou pseudo-hifas é suficiente para diagnóstico da infecção (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

3.4 Resistência

Os isolados clínicos com resistência são crescentes em todo o mundo. Tanto espécies de *Candida albicans* como não-*albicans* são relatadas expressando resistência a pelo menos um antifúngico. Apesar da introdução de novos agentes, os casos de resistência são uma preocupação relevante para prática clínica. Antifúngicos como a anfotericina B e a caspofungina apresentam menores taxas de resistência em comparação aos azóis, principalmente o fluconazol, que representa grande parte dos casos de *Candida* resistente (CHEN et al., 2012)

De maneira geral, a resistência microbiana pode ser considerada como casos onde a infecção não é suprimida por doses de agentes terapêuticos dentro dos padrões de concentrações e horários pré-estabelecidos, sendo necessária a utilização de concentrações maiores que as usadas rotineiramente na prática clínica, podendo estar relacionada a dosagens que caem numa faixa de risco de toxicidade. Os testes de susceptibilidade *in vitro* aos agentes antimicrobianos são frequentemente utilizados para avaliar qual melhor terapia antifúngica, porém podem auxiliar no monitoramento dos perfis de resistência e predizer quais terapias poderão apresentar falhas no tratamento (PFALLER, 2012).

O desenvolvimento da resistência fúngica é mediado por expressão genética de diversos grupos de proteínas. As expressões de genes como MDR1, CDR1, CDR2 e FLU1 codificam proteínas que facilitam o desenvolvimento de mecanismos de resistência por expressão de bombas de efluxo as quais exportam da célula fúngica uma significativa quantidade de fármaco. Esse mecanismo é considerado um dos principais responsáveis por resistência a diversos agentes antifúngicos (SALCI et al., 2018).

Outros mecanismos de resistência desenvolvidos por estirpes de *Candida* são modificações nos alvos dos fármacos, como ocorre em estirpes resistentes aos azóis e/ou poliênicos. Nesses casos ocorrem alterações estruturais nos alvos específicos dos agentes

antifúngicos. Essas modificações geram uma ausência ou uma redução de afinidade na ligação dos fármacos aos alvos terapêuticos na célula e conseqüentemente uma menor eficácia nos tratamentos (PFALLER, 2012).

3.4.1 Resistência aos poliênicos

O mecanismo de resistência aos poliênicos é pouco definido, porém análises de estirpes resistentes mostram que podem ser resultados de alterações qualitativas e quantitativas no conteúdo de ergosterol. Isolados resistentes apresentam uma menor quantidade de ergosterol, substituição por outros esteróis aos quais os poliênicos apresentam maior afinidade (ergosterol) por outros com menor capacidade de ligação (fecosterol) ou o impedimento estérico e termodinâmico da ligação dos fármacos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

3.4.2 Resistência aos azóis

Os mecanismos de resistência aos azóis podem ser por alterações na enzima-alvo, levando a uma diminuição na afinidade dos fármacos, devido a mutações no gene que codifica a produção da enzima (ERG11), superexpressão do gene ERG11 causando um aumento na quantidade intracelular da enzima-alvo, necessitando de maiores concentrações de fármaco ou a indução de genes que codificam bombas de efluxo ativo dos azóis (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). A expressão de CDR1, CDR2 e MDR1 é uma das principais causas da resistência fúngica por meio do transporte ativo das substâncias para fora da célula fúngica mediado por bombas de efluxo (SALCI et al., 2018). Esses mecanismos podem atuar de forma isolada, sequencial ou em paralelo, levando a uma resistência progressiva para níveis mais altos de fármacos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

3.5 Tratamento

Infecções fúngicas são, em sua maioria, mais difíceis de tratar quando comparadas a infecções bacterianas. As principais causas dessa dificuldade residem no fato das infecções por fungos atingirem tecidos os quais os agentes terapêuticos têm baixo acesso. Outro complicador dos tratamentos dessas infecções é o crescimento lento dos fungos, que acarreta

em um maior período de tratamento. Infecções profundas causadas por *Candida* respondem a um número de agentes terapêuticos limitados (CRAIG; STITZEL, 2011). As classes de fármacos utilizados nos tratamentos orais, superficiais e/ou intravenosos são os poliênicos, os azóis, as equinocandinas e análogos de pirimidina (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Os poliênicos como a anfotericina B e a nistatina apresentam o mesmo mecanismo de ação. A anfotericina B é de origem natural, produzida por *Streptomyces*, e consiste em um anel com regiões que apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas. Seu mecanismo de ação é devido sua afinidade pelo ergosterol, componente fundamental da membrana celular fúngica. A ligação das moléculas de anfotericina B a membrana causa um aumento na permeabilidade levando a perdas de componentes intracelulares dos fungos (CRAIG; STITZEL, 2011; CAMPOY; ADRIO, 2017). A anfotericina B também apresenta afinidade pelo colesterol da membrana celular de mamíferos, caracterizando assim a maior parte dos efeitos adversos de sua administração (CRAIG; STITZEL, 2011).

Casos de resistência a anfotericina B são relatados, principalmente devido a alterações no ergosterol da membrana fúngica. Infecções causadas por micro-organismos com resistência intrínseca a anfotericina, como *Candida lusitanae*, ainda são raros (CRAIG; STITZEL, 2011).

Reações colaterais como febre, calafrios, e problemas hematológicos podem ser observados com administração intravenosa de anfotericina, porém o efeito adverso mais grave do seu uso em longo prazo é a elevada nefrotoxicidade, causada por diminuição do fluxo sanguíneo nos glomérulos e túbulos renais, o que pode ocasionar destruição das células e defeitos na membrana basal tubular (CRAIG; STITZEL, 2011).

A classe dos azóis compreende um conjunto de compostos de origem sintética, com uma ampla ação contra fungos infecciosos, apresentando atividade fungistática. Os azóis expressam seu mecanismo de ação antifúngica por inibição enzimática ao ligarem-se as enzimas do citocromo p450 (14 α -lanesterol desmetilase) que convertem lanesterol em ergosterol (CRAIG; STITZEL, 2011; CAMPOY; ADRIO, 2017). A inibição da biossíntese do ergosterol causa uma redução de suas quantidades na membrana. Essa redução torna as membranas danificadas e facilmente permeáveis (CRAIG; STITZEL, 2011).

O cetoconazol é um representante dos azóis com boas características para utilização contra infecções por *Candida*. Atualmente o cetoconazol vem sendo substituído por novos azóis para o tratamento de infecções disseminadas. Durante sua administração é comum efeitos adversos como náuseas, vômito, anorexia, desconforto gástrico e elevação reversível das enzimas hepáticas. Quando utilizado em altas dosagens em homens pode ocorrer

ginecomastia, impotência, redução da libido e na contagem de espermatozoides. Em mulheres podem ocorrer menstruações irregulares com uso prolongado do cetoconazol (CRAIG; STITZEL, 2011).

A flucitosina é um exemplo de análogo de pirimidina sintético. Apresenta pouca eficácia nos tratamentos em monoterapia, devido ao rápido surgimento de resistência fúngica, por isso é frequentemente utilizada em associação a anfotericina B. Seu mecanismo de ação é por interferência na síntese de DNA ao inibir a timidilato sintetase (CRAIG; STITZEL, 2011).

O primeiro representante da classe das equinocandinas é a caspofungina. Apresenta boa atividade antifúngica tendo como modo de ação a inibição da síntese de β -(1,3)-D-glicano, componente da membrana celular (CRAIG; STITZEL, 2011).

3.6 Novos antifúngicos

O tratamento de infecções por *Candida* com antifúngicos atualmente disponíveis está se tornando cada vez mais problemático devido à crescente resistência. Essa dificuldade tem direcionado a busca por novas alternativas terapêuticas, principalmente com raros ou nenhum efeito adverso (SHARIFZADEH et al., 2017). Um novo antifúngico ideal deve ter características como amplo espectro de ação causando o menor número possível de reações indesejáveis ao seu uso (SCORZONI et al., 2016).

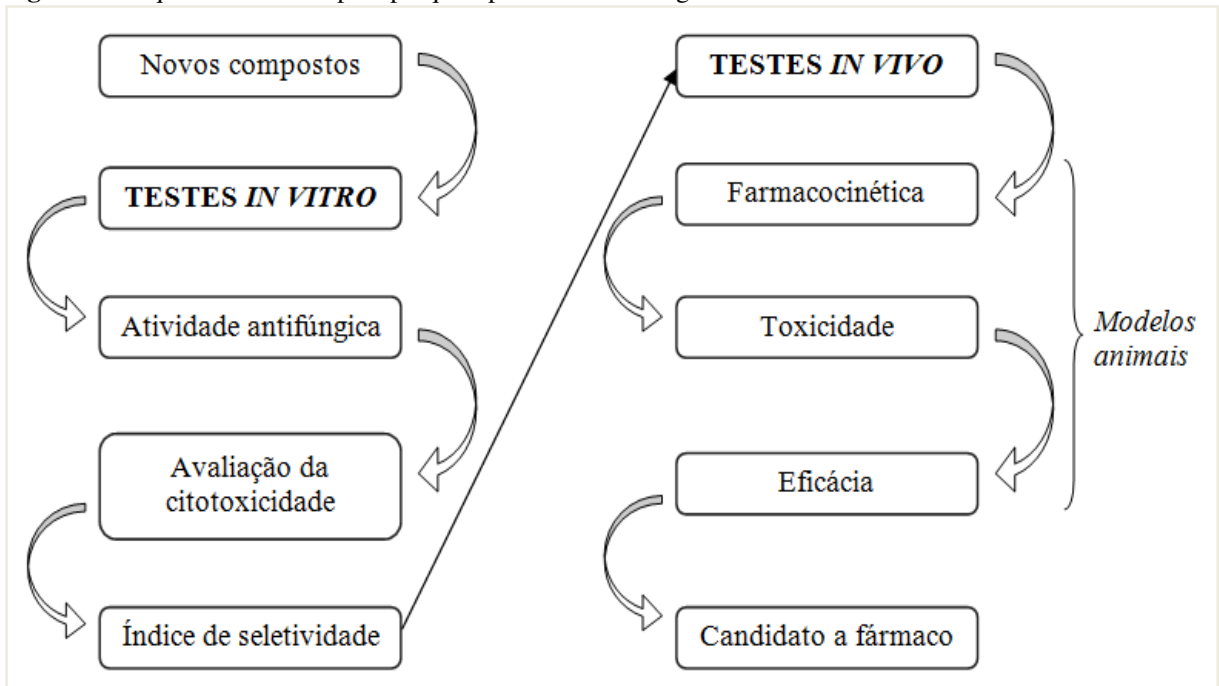
A alta semelhança entre as células fúngicas com as células humanas é um fator limitante para o desenvolvimento de tratamentos eficientes e seguros ao hospedeiro. O número de agentes terapêuticos para infecções fúngicas é limitado se comparado aos antibacterianos. Na atualidade os esforços estão concentrados na busca por novas moléculas antifúngicas, sobretudo com novos alvos terapêuticos específicos para os fungos, que possibilitem uma atividade mais específica nas células do micro-organismo e menor efeito nas células humanas (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Apesar da descoberta de novas moléculas com atividade antifúngica e o desenvolvimento de formulações que aumentam a biodisponibilidade e reduzem efeitos tóxicos, a pesquisa por antifúngicos ideais é uma necessidade permanente (SCORZONI et al., 2016).

Os ensaios *in vitro* para triagem de novos compostos com potencial antifúngico evoluíram nos últimos anos, principalmente devido à implantação de metodologias padronizadas pelo Instituto de Normas de Laboratório Clínico - (CLSI). Um dos métodos *in*

in vitro mais utilizados para triagem de agentes antifúngicos é a microdiluição em caldo, que se torna muito útil devido sua boa reprodutibilidade, baixo consumo de amostra, baixo custo e aplicabilidade a uma ampla gama de espécies de fungos (SCORZONI et al., 2016). Uma boa atividade *in vitro* de uma molécula pode direcionar para próximos ensaios de atividade antifúngica, conforme mostra a sequência de ensaios na Figura 2.

Figura 2 - Sequência de testes para pesquisa por novos antifúngicos.



Fonte: Adaptado de Scorzoni et al. 2016.

3.7 Associações

A monoterapia no tratamento de infecções fúngicas frequentemente pode apresentar falhas, nesses casos a combinação da terapia antifúngica pode ser uma importante alternativa terapêutica (MARTIN-VICENTE; GUARRO; CAPILLA, 2017). Um número significativo de estudos *in vitro* demonstra o resultado da combinação de agentes antifúngicos comparados aos testes destas substâncias isoladas. A importância clínica das associações derivou-se do início da utilização da flucitosina em terapia associada com a anfotericina B. Os testes *in vitro* apresentam, de forma empírica, os efeitos clínicos da terapia combinada. A possibilidade de alterar as concentrações do fármaco é uma enorme vantagem da utilização dos métodos *in vitro* (GRAYBILL, 2012).

Na interpretação dos testes *in vitro* de associações podemos prever que uma associação é sinérgica caso o efeito das substâncias seja maior em associação quando

comparado ao efeito da sua utilização isolada, ou seja, a concentração capaz de produzir inibição dos micro-organismos pelas substâncias foi reduzida na associação frente a monoterapia. Em contrapartida, quando as concentrações necessárias para gerar inibição antifúngica são maiores na associação em relação aos valores das substâncias isoladas, é considerada uma associação antagônica (GRAYBILL, 2012).

As interações sinérgicas entre agentes antifúngicos apresentam grandes benefícios em relação aos tratamentos isolados de fármacos, tais como o aumento da atividade e no espectro das substâncias, a redução da toxicidade por necessitar de doses menores e potencialmente menos tóxicas, redução no risco de desenvolvimento de resistência (CAMPITELLI et al., 2017).

Mesmo com a busca por interações sinérgicas entre os antifúngicos algumas variações nas associações *in vitro* são descritas, sendo observados efeitos que variam de sinérgicos ao antagonismo (MARTÍN-PEÑA et al., 2014; CAMPITELLI et al., 2017). A interação antagônica entre antifúngicos apresenta desvantagens que podem limitar sua utilização devido o risco de aumentar a toxicidade dos fármacos, por necessitar de maiores doses, e causar a redução do efeito das substâncias na associação. Nesse contexto, é fundamental para a prática clínica a determinação *in vitro* da interação entre as substâncias a serem utilizadas (CAMPITELLI et al., 2017).

A associação de substâncias com modos de ação diferentes é melhor aceita, pois a utilização de substâncias de mecanismos diferentes preserva a eficiência uma da outra, evitando o surgimento de resistência aos agentes. Os tratamentos com fármacos associados podem prevenir o surgimento da resistência, porém são limitados devido a poucas opções e a ausência de ensaios clínicos (KIBBLER, 2012).

Os resultados de associações obtidos *in vitro* pela metodologia de checkerboard podem apresentar variações, entretanto é uma das metodologias mais utilizadas para determinação da interação de fármacos antifúngicos *in vitro*, apresentando vantagens como a praticidade de realização e facilidade na interpretação dos resultados (MARTIN-VICENTE; GUARRO; CAPILLA, 2017).

3.8 Glicosídeos

O conjunto de substâncias denominadas glicosídeos, de maneira geral, são compostos que apresentam em suas estruturas básicas uma parte glicona (açúcar) e outra parte aglicona.

A parte aglicona da molécula liga-se ao carbono C1(anomérico) da glicona por uma ligação chamada glicosídica (MATA, 2017).

. Os glicosídeos são um grupo de moléculas que ao longo dos anos estão sendo largamente estudados nas suas mais diversas aplicações. Entre os anos de 2000 a 2017 cerca de 800 artigos foram encontrados indexados na base de dados da *Web of Science* utilizando como descritor O-glicosídeos. Esse período é acompanhado também de grandes avanços na rota de síntese desses compostos. A grande versatilidade dos glicosídeos permite sua aplicação em diversas áreas de pesquisa (MOURA et al., 2018).

De acordo com a sua estrutura os glicosídeos podem ser classificados em O, C, N ou S-glicosídeos. Essa classificação baseia-se no átomo presente entre a parte glicona e a parte aglicona da molécula. Se ambas as partes 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).

O-glicosídeos são encontrados apresentando diferentes atividades biológicas, como por exemplo, a salicina com atividade anti-inflamatória, o catalpol que possui atividade anti-hiperglicêmica e a macrolactina O com atividade antibacteriana (MOURA et al., 2018).

Outras possibilidades de atividades biológicas dos glicosídeos são largamente avaliadas. Algumas das atividades dos glicosídeos observadas incluem atividade antibacteriana (QIAO et al., 2016; BRAHIMI; BELKADI; OTHMAN, 2017), capacidade antioxidante (IWADATE et al., 2014), inibição da proliferação de células tumorais (MOURA et al., 2018; ZI et al., 2015) e atividade antifúngica (KHAN et al., 2017) .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

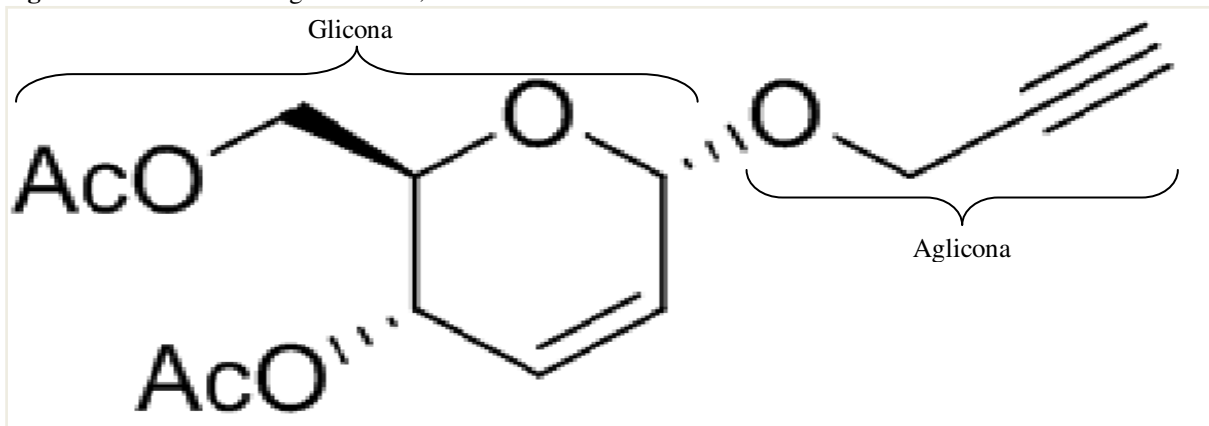
4.1 Local de trabalho

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de bioquímica (J-08) e Laboratório de Microbiologia (J-11) do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité.

4.2 O-glicosídeo 2,3-insaturado

O O-glicosídeo 2,3-insaturado (Nome IUPAC; Prop-2- in-1- il 4,6-di-O-acetil- 2,3-didesoxi- α -D-eritro-hex- 2-enopiranosídeo) (Figura 3) utilizado nos ensaios foi cedido pelo Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas, do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande. Os processos de síntese, purificação e caracterização do composto foram realizados pelo Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas.

Figura 3 - Estrutura do O-glicosídeo 2,3-insaturado.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.3 Espécies fúngicas utilizadas

Foram utilizadas as cepas fúngicas de *Candida krusei* LM-13, *Candida parapsilosis* ATCC-20019, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *Candida guilliermondii* LM-703. As cepas foram adquiridas da micoteca da Universidade Federal da Paraíba e mantidas sob refrigeração a aproximadamente 4 °C, sendo realizadas subculturas (repique) periodicamente, em Agar Sabouraud Dextrose, para manutenção e viabilidade das mesmas.

4.4 Preparo do inóculo

O inóculo fúngico foi padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a uma concentração de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (CLSI, 2008).

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008), utilizando como meio o Caldo Sabouraud Dextrose (CASTRO; LIMA, 2011; CORTEZ et al., 2015). A concentração inicial do O-glicosídeo 2,3-insaturado foi de 512 $\mu\text{g/mL}$ e diluída seriadamente 1:2 até a concentração final de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações iniciais da anfotericina B e do cetoconazol foram de 128 $\mu\text{g/mL}$ e diluídas seriadamente 1:2 até a concentração final de 0,0078 $\mu\text{g/mL}$. O inóculo foi adicionado em uma concentração final de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/mL em cada cavidade. As soluções foram preparadas com o auxílio de dimetilsulfóxido (DMSO). Foram utilizados controles positivos com DMSO nas mesmas concentrações utilizadas no teste.

Os ensaios foram incubados, em estufa a aproximadamente 35°C, durante 48 horas. Foi considerada como CIM, a menor concentração da substância testada capaz de produzir inibição visual do crescimento das cepas de levedura utilizadas nos ensaios microbiológicos (CLSI, 2008).

4.6 Associação das substâncias

Para realização da associação das substâncias foram preparadas, separadamente, diferentes soluções das substâncias nas concentrações de CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8.

O estudo das associações foi realizado pela técnica do checkerboard para determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), utilizando placas estéreis de microdiluição com 96 cavidades. As soluções foram distribuídas na placa de forma que todas as concentrações da substância A (glicosídeo), na vertical, combinassem com todas as concentrações da substância B (anfotericina B ou cetoconazol), na horizontal.

O experimento foi conduzido com inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL em cada cavidade da placa. Para realização das associações foi utilizada a cepa fúngica *Candida tropicalis* ATCC-13803.

Os ensaios foram incubados em estufa, a 35°C, por 48 horas e após esse período determinada a CIM da associação.

4.7 Determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

O ICIF foi calculado através da equação; $ICIF = CIF^A + CIF^B$. Onde Concentração Inibitória Fracionária^A (CIF^A) é calculado pela relação: CIM^A combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; SILVA et al., 2011). Sendo A o glicosídeo, e B a anfotericina B ou o cetoconazol.

O ICIF foi classificado da seguinte forma: sinergismo ($\leq 0,5$), indiferença ($> 0,5 < 4$) e antagonismo (≥ 4) (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; SILVA et al., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados da avaliação das concentrações inibitórias mínimas do glicosídeo e dos antifúngicos utilizados nos ensaios. Observa-se que o glicosídeo não apresentou atividade inibitória contra nenhuma das espécies de *Candida* utilizadas no ensaio.

Tabela 1 - Valores das CIMs do glicosídeo, da anfotericina B e do cetoconazol, frente as cepas de *Candida* não-*albicans*.

Espécie fúngica	CIM glicosídeo	CIM anfotericina B	CIM cetoconazol
<i>C. krusei</i> LM-13	+	2 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>C. parapsilosis</i> ATCC-20019	+	2 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	2 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>C. guilliermondii</i> LM-703	+	0,5 µg/mL	0,125 µg/mL

Fonte: Dados da pesquisa.

CIM: Concentração Inibitória Mínima; +: Crescimento fúngico em todas as concentrações, ou seja, ausência de atividade antifúngica nas concentrações testadas.

Embora a maior concentração testada do glicosídeo (512 µg/mL) não tenha apresentado atividade antifúngica, as soluções múltiplas e frações da CIM utilizadas nas associações foram preparadas considerando-a como a CIM.

Apesar de escassos, relatos na literatura apresentam glicosídeos com atividades antifúngicas contra fungos patogênicos. Khan et al. (2017), em recente revisão, relatam a atividade antifúngica de glicosídeos de origem vegetal contra *Candida* e outros fungos que acometem infecções, assim como os efeitos pelos quais os glicosídeos expressaram suas atividades, que não se limitaram a apenas um mecanismo de ação. O estudo dos mecanismos de ação desses compostos propôs inibição da via da calcineurina, perturbação da membrana celular e formação de complexos com esteróis da membrana fúngica. Com base na variedade nos mecanismos de ação dos glicosídeos, sua utilização poderia apresentar vantagens frente aos antifúngicos de único mecanismo de ação, tais como melhor forma de lidar com surgimento de resistência aos antifúngicos convencionais e menores taxas de desenvolvimento de resistência aos glicosídeos.

Guo et al. (2017) realizaram o isolamento, identificação e teste da atividade antimicrobiana de glicosídeos de *Coreopsis tinctoria* onde não foi observada atividade antifúngica contra *Candida* e uma boa atividade antibacteriana.

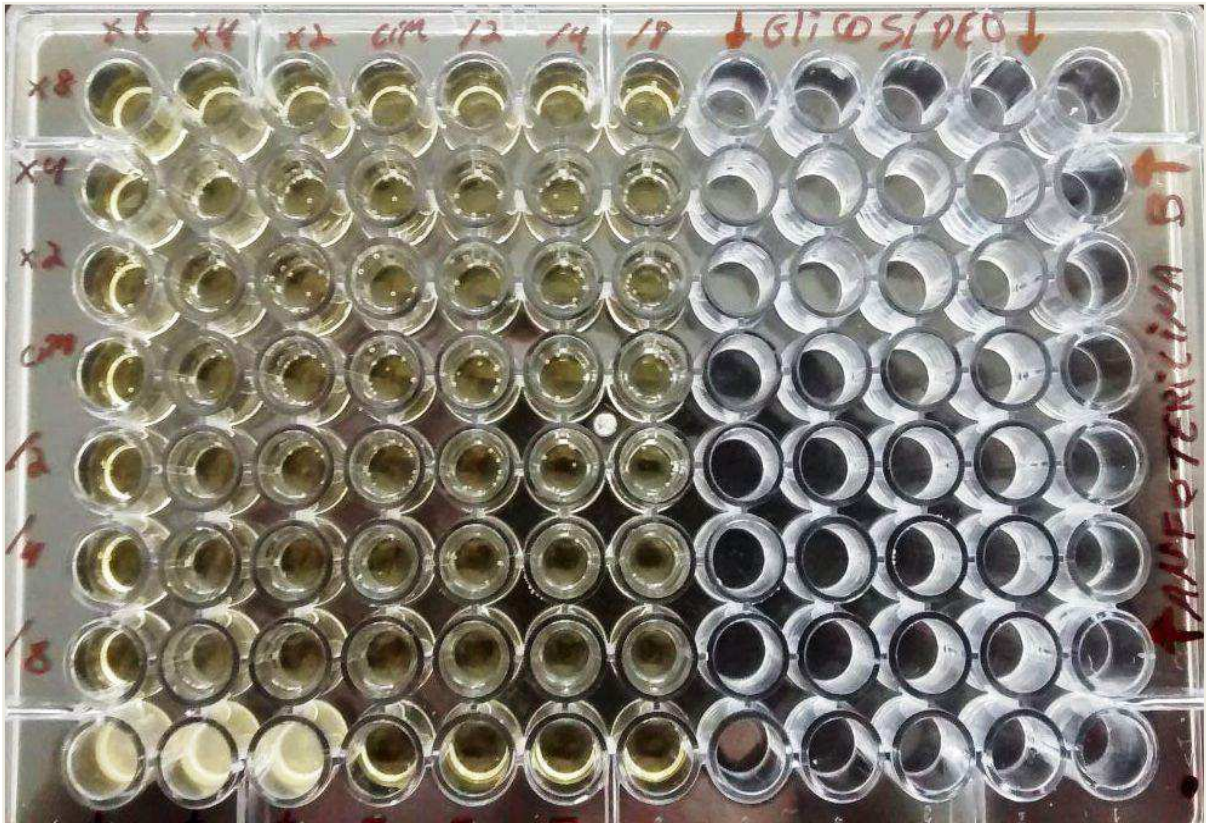
Glicosídeos sintéticos com estruturas similares ao composto utilizado no presente estudo foram sintetizados e avaliadas as suas possíveis atividades antibacterianas. Os resultados demonstraram um bom potencial antibacteriano *in vitro* dos glicosídeos, obtendo melhores valores de inibição bacteriana que os observados pelos seus precursores não glicosilados (QIAO et al., 2016; BRAHIMI; BELKADI; OTHMAN, 2017).

Outros estudos descrevem atividades biológicas dos glicosídeos obtidos por via sintética. Iwadate et al. (2014) descrevem a síntese química e a inibição enzimática da tirosinase, enzima responsável pela oxidação fenóis, por glicosídeos sintéticos. Zi et al. (2015) descrevem a síntese e capacidade antitumoral de glicosídeos sintéticos contra diferentes tipos de linhagens celulares cancerígenas.

Com relação ao estudo das associações, entre o glicosídeo e a anfotericina B foi observada redução significativa da CIM da anfotericina quando associada, levando a uma inibição fúngica em todas as concentrações cruzadas com as concentrações do glicosídeo, mesmo em concentrações muito baixas como CIM/8, conforme é visualizado na figura 4. A confirmação do resultado promissor dessa combinação é observada pelo valor do ICIF (Tabela 2).

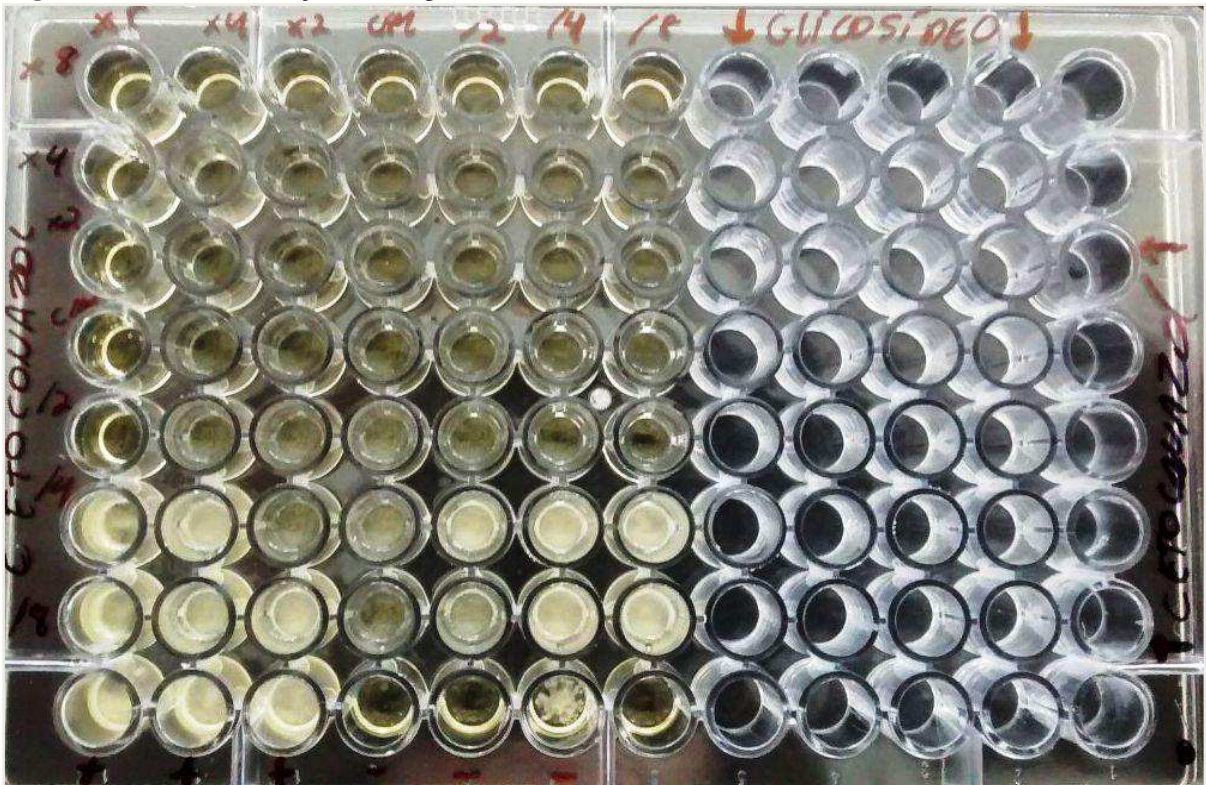
Diferentemente da combinação anterior, a associação entre o cetoconazol e o glicosídeo não apresentou melhor resultado em comparação ao resultado isolado doazol (Tabela 2), sendo observado que não houve redução significativa nas concentrações inibitórias para o cetoconazol (Figura 5).

Figura 4 - Placa da associação entre o glicosídeo e a anfotericina B.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 5 - Placa da associação entre o glicosídeo e o cetoconazol.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 - Associação entre o glicosídeo e os antifúngicos contra *C. tropicalis* ATCC-13803.

Glicosídeo	Anfotericina B	Cetoconazol	ICIF	Interação
CIF 0,125	CIF 0,125	--	0,25	Sinergismo
CIF 0,125	--	CIF 0,5	0,625	Indiferença

Fonte: Dados da pesquisa.

CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice da Concentração Inibitória Fracionada.

Segundo Liu et al. (2014) existem algumas limitações nas combinações de antifúngicos como os altos custos, efeitos indesejáveis e resultados contraditórios de ações sinérgicas ou antagônicas de algumas combinações de antifúngicos. Dessa forma, pesquisas têm sido direcionadas com foco em avaliar combinações de antifúngicos com não-antifúngicos.

Liu et al. (2014) ressaltam a importância da combinação de antifúngicos com agentes não antifúngicos, a exemplo da combinação com antibacterianos, sobretudo em infecções fúngicas profundas.

A gentamicina é um aminoglicosídeo que possui em sua estrutura grupamentos que se assemelham aos encontrados no glicosídeo utilizado no presente estudo. Segundo Lu et al. (2018) antibacterianos da classe dos aminoglicosídeos são relatados expressando atividade antifúngica e associações sinérgicas com antifúngicos. Em recente estudo Lu et al. (2018) analisaram a atividade antifúngica da gentamicina e sua associação com azóis contra *Candida*. Observou-se que a gentamicina apresentou CIM >512 µg/mL e sua associação foi sinérgica com antifúngicos da classe dos azóis.

Agentes que não apresentaram atividade antifúngica (azitromicina, ciprofloxacina, fluvastatina, ibuprofeno, metronidazol e rifampicina) foram combinados com a anfotericina B ou voriconazol contra *Fusarium*. Como resultado teve-se que todas as associações dos agentes não-antifúngicos com a anfotericina B foram sinérgicas, enquanto que as associações dos não-antifúngicos com o voriconazol foram indiferentes (VENTURINI et al., 2011).

Diversos agentes não antifúngicos como os inibidores da calcineurina, inibidores da proteína 90 de choque térmico, reguladores da homeostase do cálcio, assim como anti-inflamatórios não esteroidais têm sido combinados com fluconazol, observando-se resultados sinérgicos. Fato importante é que combinações *in vitro* do ibuprofeno com o fluconazol contra estirpes resistentes ao fluconazol apresentam sinergia, porém essa mesma ação não é observada em estirpes sensíveis ao fluconazol (LIU et al., 2014).

Assim como a metodologia adotada em nosso trabalho, um estudo foi realizado com a associação de concentrações não inibitórias de substâncias não-antifúngicas (estatinas) com antifúngicos (azóis), sendo observado sinergismo na associação das substâncias contra *Candida não-albicans* (CABRAL; FIGUEROA; FARIÑA, 2013).

Outros estudos apresentam sinergia entre agentes antifúngicos com não-antifúngicos. Venturini et al. (2017) demonstram a atividade sinérgica entre antifúngicos e amiodariona, doxiciclina e moxifloxacina. Sun et al. (2017) relatam a sinergia entre a dexametasona e o fluconazol contra espécies de *Candida*, onde foi observado que o provável mecanismo que corroborou para tal atividade foi devido a inibição do efluxo do antifúngico do meio intracelular.

Um exemplo clássico de fármaco com pouca utilização contra infecções fúngicas em monoterapia é a fluocitosina, devido ao limitado espectro de ação e fácil desenvolvimento de resistência microbiana. Porém, é comumente utilizada em associação com a anfotericina B na prática clínica em decorrência da forte sinergia existente na associação das substâncias (CRAIG; STITZEL, 2011).

Os mecanismos pelos quais os resultados da associação do glicosídeo com a anfotericina B foram diferentes da associação com o cetoconazol não foram avaliados, porém estima-se que possivelmente seja decorrente das diferenças entre os mecanismos de ação dos poliênicos e dos azóis.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que apesar das dificuldades nos tratamentos para infecções fúngicas, esforços estão sendo feitos por parte de diversas linhas de pesquisa, seja para descoberta de novos agentes antifúngicos ou para a associação de substâncias que apresentem sinergismo com antifúngicos consagrados que estão apresentando falhas nos tratamentos. Os resultados encontrados demonstram que o glicosídeo utilizado no presente estudo não apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra *Candida não-albicans*, resultado que inviabiliza sua utilização isolada para tratar tais infecções, porém expressa forte sinergismo quando utilizado em associação *in vitro* com a anfotericina B, sendo necessária a realização de estudos que comprovem essa mesma atividade em testes *in vivo*, para que possa ser traçada uma possível alternativa terapêutica dessa combinação para o tratamento de infecções por *Candida*.

REFERÊNCIAS

- BAKER, Perrin et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Science advances**, v. 2, n. 5, mai, 2016.
- BRAHIMI, Fawzia Taieb; BELKADI, Mohamed; OTHMAN, Adil A. Synthesis of nonionic surfactants with azole ring bearing N-glycosides and their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, supl. 2, p. S1690-S1698, mai, 2017.
- CABRAL, María Eugenia; FIGUEROA, Lucía IC; FARIÑA, Julia I. Synergistic antifungal activity of statin azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* bioassays and ergosterol quantification. **Revista iberoamericana de micología**, v. 30, n. 1, p. 31-38, jan, 2013.
- CAMPITELLI, Marco et al. Combination Antifungal Therapy: A Review of Current Data. **Journal of clinical medicine research**, v. 9, n. 6, p. 451-456, jun, 2017.
- CAMPOY, Sonia; ADRIO, José L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86-96, jun, 2017.
- CASTILLO, Graciela Del Valle et al. Study of virulence factor of *Candida* species in oral lesions and its association with potentially malignant and malignant lesions. **Archives of Oral Biology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.02.012>.
- 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.
- CHEN, Tun-Chieh et al. Fluconazole exposure rather than clonal spreading is correlated with the emergence of *Candida glabrata* with cross-resistance to triazole antifungal agents. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 28, n. 6, p. 306-315, jun, 2012.
- CHEN, Yu et al. Spirostanol glycosides with hemostatic and antimicrobial activities from *Trillium kamschaticum*. **Phytochemistry**, v. 131, p. 165-173, nov, 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard – 3. ed. CLSI document M27-A3. Wayne, 2008.
- CORTEZ, Lúcia Elaine Ranieri et al. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). **O Mundo da Saúde, São Paulo**, v. 39, n. 4, p. 433-440, nov, 2015.
- CRAIG, Charles R; STITZEL, Robert E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. Tradução 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- EISSA, Ahmed M. et al. Glycosylated nanoparticles as efficient antimicrobial delivery agents. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 8, p. 2672-2679, jul, 2016.

FUENTEFRIA, Alexandre et al. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias. **Journal of Infection Control**, v. 5, n. 1, 2016.

GOLDANI, Luciano Z.; SANTOS, Rodrigo P. Candida tropicalis as an emerging pathogen in Candida meningitis: case report and review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 631-633, nov-dez, 2010.

GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GRAYBILL, John R. Combination Antifungal Therapy: Is it for everyone and every mycosis?. **Infectio**, v. 16, supl. 3, p. 11-22, dez, 2012.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, supl. 6, p. 5-10, jun, 2014.

GUO, Jia et al. Isolation, characterization and antimicrobial activities of polyacetylene glycosides from *Coreopsis tinctoria* Nutt. **Phytochemistry**, v. 136, p. 65-69, abr, 2017.

HALL, Danielle et al. In vitro potency and fungicidal activity of CD101, a novel echinocandin, against recent clinical isolates of *Candida* spp. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 89, n. 3, p. 205-211, nov, 2017.

HEMAISWARYA, Shanmugam; KRUTHIVENTI, Anil Kumar; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, ago, 2008.

IWADATE, Takehiro et al. Chemical synthesis and tyrosinase inhibitory activity of rhododendrol glycosides. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 1, p. 122-125, jan, 2014.

KHAN, Haroon et al. Plant bioactive molecules bearing glycosides as lead compounds for the treatment of fungal infection: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 498-509, set, 2017.

KIBBLER, Christopher C. The Pro-debate: How can we improve the outcome of invasive fungal infection? The case for combination therapy. **Infectio**, v. 16, supl. 3, p. 3-10, dez, 2012.

LIMA, Igara de Oliveira et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, jun, 2006.

LIU, Shuyuan et al. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, mai, 2014.

LOCKHART, Shawn R. Current epidemiology of *Candida* infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131-136, set, 2014.

LU, Mengjiao et al. Gentamicin synergises with azoles against drug-resistant *Candida albicans*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 1, p. 107-114, 2018.

MARTÍN-PEÑA, Almudena et al. Antifungal combination therapy for invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 10, p. 1437-1445, nov, 2014.

MARTIN-VICENTE, Adela; GUARRO, Josep; CAPILLA, Javier. Does a triple combination have better activity than double combinations against multiresistant fungi? Experimental in vitro evaluation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 4, p. 422-426, abr, 2017.

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.

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.

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. Tradução 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

PFALLER, Michael A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, jan, 2012.

QIAO, Ying et al. Efficient enzymatic synthesis and antibacterial activity of andrographolide glycoside. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 675-680, mai, 2016.

SAHU, Jagdish K.; GANGULY, Swastika; KAUSHIK, Atul. Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. **Chinese journal of natural medicines**, v. 11, n. 5, p. 456-465, set, 2013.

SALCI, Tânia P. et al. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug Discovery Today**, jan, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.003>.

SANKARI, S. Leena et al. *Candida* in potentially malignant oral disorders. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 7, supl. 1, p. S162-S164, abr, 2015.

SANTANA, Diorgenes Pinto et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, mai-ago, 2013.

SAV, Hafize et al. The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species in cases of onychomycosis infection. **Microbial pathogenesis**, v. 116, p. 257-262, mar, 2018.

SCORZONI, Liliana et al. Searching new antifungals: the use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of microbiological methods**, v. 123, p. 68-78, abr, 2016.

SHARIFZADEH, Aghil et al. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 390-396, jun, 2017.

SILVA, Filomena et al. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 42-47, dez, 2011.

SRINIVASAN, Anand; LOPEZ-RIBOT, Jose L.; RAMASUBRAMANIAN, Anand K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 65-71, mar, 2014.

SUN, Wenwen et al. Strong synergism of dexamethasone in combination with fluconazole against resistant *Candida albicans* mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 3, p. 399-405, set, 2017.

TREVIÑO-RANGEL, Rogelio de J. et al. Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single center study in Mexico. **Revista iberoamericana de micología**, v. 35, n. 1, p. 11-16, jan-mar, 2017.

VENTURINI, Tarcieli Pozzebon et al. In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 71, n. 2, p. 126-130, out, 2011.

VENTURINI, Tarcieli Pozzebon et al. Do antibacterial and antifungal combinations have better activity against clinically relevant *Fusarium* species? in vitro synergism. **International journal of antimicrobial agents**, nov, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.017>.

ZI, Cheng-Ting et al. Synthesis and antitumor activity of novel per-butyrylated glycosides of podophyllotoxin and its derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1437-1446, abr, 2015.