



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

MARIA FRANNCIELLY SIMÕES DE MORAIS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS, CONTENDO ANEL 1,2,4-OXADIAZOL, SOBRE FUNGOS
POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS**

CUITÉ – PB

2017

MARIA FRANNCIELLY SIMÕES DE MORAIS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS, CONTENDO ANEL 1,2,4-OXADIAZOL, SOBRE FUNGOS
POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Santos Carmo

CUITÉ – PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes - CRB 15 - 256

M827i Morais, Maria Franncielly Simões de.

Investigação do potencial antifúngico de compostos heterocíclicos, contendo anel 1, 2, 4 - oxadiazol, sobre fungos potencialmente patogênicos. / Maria Franncielly Simões de Morais. - Cuité: CES, 2017.

54 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) - Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientador: Egberto Santos Carmo.

1. Atividade antifúngica. 2. Composto heterocíclicos. 3. Anel 1, 2, 4 - oxadiazol. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 635.8

MARIA FRANNCIELLY SIMÕES DE MORAIS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS, CONTENDO ANEL 1,2,4-OXADIAZOL, SOBRE FUNGOS
POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

APROVADO EM:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Egberto Santos Carmo
(Orientador/UAS/CES/UFCG)

Profª. Drª. Igara Oliveira Lima
(Examinadora/UAS/CES/UFCG)

Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas
(Examinador/UABQ/CES/UFCG)

Dedico este trabalho ao meu tio Claudio, que sempre acreditou no meu sonho e me incentivou à ir além. És meu exemplo de força, determinação e superação.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pelo dom da vida, saúde, força e determinação para que este sonho se tornasse realidade. Foi Ele que me sustentou todas as vezes em que a caminhada parecia difícil, quando o desespero, a angústia e os pensamentos negativos me tomavam, era Ele que me tomava pelos seus braços e me mostrava o quanto sou forte e que Ele jamais me abandonaria ou me proporcionaria algo que me julgasse incapaz. Sonhei e Ele realizou!

Ao meu tio Claudio e minha avó Severina, que sempre acreditaram, apoiaram e sonharam comigo. Mesmo diante das dificuldades, nunca me deixaram desistir. Apesar da distância, se fizeram presentes em todos os momentos da minha graduação com palavras que conseguiam acalmar meu coração nos momentos em que mais precisei. Sou grata à Deus pela família que Ele me deu. Obrigada por tudo. À vocês devo tudo que sou!

Ao meu avô João Ribeiro (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presente fisicamente, sei que cuidou e continua cuidando de mim. Para sempre te amarei!

À toda minha família, mãe, irmã, tios, tias, primos, primas, padrinho, madrinhas e afilhado, pelo apoio durante todos esses anos.

Ao meu namorado, Diogo Gutemberg, por sempre me apoiar e acreditar que sou capaz. Obrigada por todo carinho, cuidado e paciência.

À minha amiga-irmã Kallyne Medeiros e à sua família, por todo acolhimento, apoio, amor e cuidado. Deus foi muito generoso quando colocou vocês em minha vida. Vocês também são minha família!

Aos meus amigos de longas datas, em especial Antônio Filho, Ravenna Francinne e Rildely Cavalcanti, pela amizade, amor, conselhos e por todos os momentos de alegria e tristeza que compartilhamos durante todos esses anos.

Aos amigos que conheci durante a graduação, Thaynara Jorge, Gustavo Mendonça e Jade Caedoso, por toda ajuda no desenvolvimento dessa trabalho, por todos os momentos compartilhados e por cada palavra amiga. Muito obrigada!

Aos meus amigos de graduação, Michael Torres, Neves Neta, Maria Alana, Iraneide Pereira e Anelise Pinheiro. Obrigada por cada palavra de apoio, por cada momento compartilhado e por me ajudarem a carregar o fardo quando eu não mais consegui carregar sozinha. Tenho certeza que sem vocês, tudo teria sido muito mais difícil. Amo vocês!

À todos os meus colegas de turma, pelo companheirismo, alegrias, choros e sonhos compartilhados nestes 5 anos.

Às minhas companheiras de casa, Sabrina Duarte e Mara Rúbia, pela companhia, conversas, conselhos e cuidado.

Às minhas eternas professoras, Luiza Maciel (*in memoriam*) e Mônica Rodrigues, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e por todo amor. Vocês fazem parte dessa vitória!

À professora Carina Scanoni, por sua amizade, conselhos, compreensão, carinho e confiança, suas palavras de incentivo me fazem ir além. És um exemplo de profissional e pessoa.

Ao meu orientador, Egberto Santos Carmo, pela orientação exemplar, disponibilidade, compreensão e por toda a contribuição ao meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Ao professor, Juliano Carlo Rufino de Freitas, pela disponibilização das substâncias utilizadas nesta pesquisa e por todas as contribuições neste trabalho.

À professora Igara Oliveira Lima, pela disponibilidade e contribuições nesta pesquisa.

Agradeço a todos os professores do curso, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas e, a todos os demais funcionários.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste sonho e para o início de muitos outros. Meu muito obrigada!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão.
Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve e a
vida é muito para ser insignificante. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de
sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.”

Charles Chaplin

RESUMO

MORAIS, M. F. S. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS, CONTENDO ANEL 1,2,4-OXADIAZOL, SOBRE FUNGOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS. 2017. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Além da incidência das micoses ter aumentado drasticamente nos últimos anos, outro grande problema é o tratamento destas infecções, dado o crescente número de microrganismos resistentes, decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos. Esse problema é exacerbado pelas incontáveis reações adversas que esses fármacos podem apresentar. Em vista disso, há uma busca constante por novas substâncias que apresentem ação antifúngica mais seguras, eficazes e potentes. Nesse contexto, compostos heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol têm sido alvo de diversos estudos farmacológicos, e apresentaram resultados promissores. Assim, o presente estudo objetivou averiguar o potencial antifúngico de oito compostos dessa natureza, frente à diferentes fungos potencialmente patogênicos, incluindo cepas filamentosas (*Aspergillus flavus* LM-27, *Aspegillus niger* LJB-01 e *Rhizopus orizae* LM-64) e leveduriformes (*Candida tropicalis* HU-01, *Trichosporon inkin* LM-67, *Geotrichum* LM-03 e *Rhodotorula* LM-014). Para tanto, realizou-se triagem microbiológica, com base na técnica de difusão em meio sólido e, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica de microdiluição seriada, e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), semeando alíquotas de 10 µL dos produtos presentes nas cavidades que não apresentaram crescimento fúngico em meio Ágar Sabouraud Dextrose. Quanto à triagem microbiológica, as quatro leveduras testadas apresentaram resistência, não sendo observados halos de inibição. No que diz respeito à CIM, todas as substâncias testadas apresentaram atividade antifúngica somente contra o fungo filamentoso *Rhizopus orizae* LM-64 com CIM de 1000 µg/mL, para uma das substâncias, e de 4000 µg/mL, para as demais substâncias. E, em relação à CFM, das oito substâncias testadas, seis delas apresentaram CFM de 4000 µg/mL. Os resultados obtidos nesta pesquisa nos permitem concluir que houve resistência fúngica a alguns dos compostos testados e que outros apresentaram baixa atividade antifúngica porém, este resultado contribui para o conhecimento da potencialidade terapêutica dessa classe de compostos tendo em vista que este é o primeiro relato da atividade antifúngica desse grupo de compostos heterocíclicos que contém o anel 1,2,4-oxadiazólico.

Palavras-chave: Atividade antifúngica, compostos heterocíclicos e anel 1,2,4-oxadiazol.

ABSTRACT

MORAIS, M. F. S. ANTIFUNGAL POTENTIAL INVESTIGATION OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS, CONTAINING 1,2,4-OXADIAZOLE RING, ON POTENTIALLY PATHOGENIC FUNGI. 2017. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

In addition to the increased incidence of mycoses in recent years, another major problem is the treatment of these infections, given the increasing number of resistant microorganisms resulting from the indiscriminate use of antimicrobials. This problem is exacerbated by the countless adverse reactions that these drugs may cause. In that way, there is a constant search for new substances that present safer, more effective and potent antifungal action. In this context, heterocyclic compounds containing the 1,2,4-oxadiazole ring have been the subject of several pharmacological studies, and presented promising results. Thus, the present study aimed to investigate the antifungal potential of eight compounds of this nature against different potentially pathogenic fungi, including filamentous strains (*Aspergillus flavus* LM-27, *Aspergillus niger* LJB-01 e *Rhizopus orizae* LM-64) and yeast strains (*Candida tropicalis* HU-01, *Trichosporon inkin* LM-67, *Geotrichum* LM-03 e *Rhodotorula* LM-014). Therefore, microbiological screening was performed based on the solid medium diffusion technique and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by serial microdilution technique, the Minimum Fungicide Concentration (MFC) was also performed by sowing aliquots of 10 µL of the products present in the wells that did not show fungal growth in Sabouraud Agar Dextrose medium. As for the microbiological screening, the four yeasts tested showed resistance, and no inhibition halos were observed. Regarding to MIC, all the substances tested showed antifungal activity only against the filamentous fungus *Rhizopus orizae* LM-64 with MIC of 1000 µg/mL for one of the substances and 4000 µg/mL for the remaining substances. In relation to MFC, out of the eight substances tested, six presented MFC of 4000 µg/mL. The results obtained in this research allow us to conclude that there was fungal resistance to some of the compounds tested and that others had low antifungal activity, but this result contributes to the knowledge of the therapeutic potential of this class of compounds, since this is the first report on the antifungal activity of this group of heterocyclic compounds containing the 1,2,4-oxadiazolic ring.

Keywords: Antifungal activity, heterocyclic compounds and 1,2,4-oxadiazole ring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação de Infecções fúngicas superficiais (A), subcutâneas (B), sistêmicas ou profundas (C). A. Candidíase oral; B. Esporotricose; C. Paracoccidioidomicose.....	21
Figura 2	Provas fisiológicas para identificação dos principais gêneros e espécies de leveduras.....	25
Figura 3	Alvos de medicamentos antifúngicos.....	26
Figura 4	Mecanismos moleculares pelos quais a célula microbiana pode desenvolver resistência.....	28
Figura 5	Estrutura do anel 1,2,4-oxadiazólico.....	29
Figura 6	Estrutura dos compostos 1,2,4-oxadiazólicos avaliados no teste da atividade antifúngica.....	31
Figura 7	Representação esquemática da preparação do inóculo dos fungos leveduriformes.....	33
Figura 8	Representação esquemática da preparação do inóculo dos fungos filamentosos.....	34
Figura 9	Esquema da microplaca utilizada na diluição de compostos heterocíclicos que apresentam em comum o anel 1,2,4-oxadiazol.....	36
Figura 10	Adição das substâncias teste diluídas aos orifícios da placa de microdiluição contendo o meio.....	36
Figura 11	Adição das suspensões fúngicas aos orifícios contendo o meio e as substâncias teste.....	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Provas bioquímicas e enzimáticas para identificação das principais leveduras de interesse clínico.....	24
Tabela 1	Resultados do <i>screening</i> da atividade antifúngica dos compostos heterocíclicos que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol a partir do método de difusão em disco.....	38
Tabela 2	Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima dos compostos heterocíclicos que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol em fungos leveduriformes e filamentosos.....	39
Tabela 3	Resultados da determinação da Concentração Fungicida Mínima dos compostos heterocíclicos que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol contra o fungo filamentoso <i>Rhizopus orizae</i> LM-64.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
mg/kg/dia	Miligrama/Quilograma/Dia
p/v	Peso/Volume
A.	<i>Aspergillus</i>
AcOEt	Acetato de etila
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
C.	<i>Candida</i>
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CES	Centro de Educação e Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
g	Gramas
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Fungos	16
3.2 Leveduras	18
3.3 Filamentosos	19
3.4 Manifestações clínicas	20
3.5 Epidemiologia	21
3.6 Diagnóstico laboratorial	22
3.7 Tratamento	26
3.8 Resistência aos antifúngicos	27
3.9 Compostos heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol	29
4. METODOLOGIA	31
4.1 Local de trabalho	31
4.2 Produtos sintéticos	31
4.3 Produto controle	32
4.4 Fungos	32
4.5 Meios de cultura	32
4.6 Inóculo	33
4.7 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	35
4.7.1 Triagem microbiológica	35
4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	35
4.7.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são seres ubiqüitários, que se disseminam na natureza, através de estruturas como esporos, conídios e artroconídeos, pelo ar, insetos, água e animais, podendo causar infecções denominadas micoses, que de acordo com o tecido ou órgão acometido são divididas em superficiais, subcutâneas e sistêmicas (MISHRA; DUBEY, 1994; NOVAK; ALMEIDA; SANTOS, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2010).

Embora a maioria dos fungos encontre-se na natureza vivendo saprofiticamente, algumas espécies são capazes de produzir doenças no homem, como os *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Cladosporium spp.* e *Rhizophus spp.* Outros agentes fúngicos como dermatófitos e leveduras do gênero *Candida* despontam entre os agentes mais frequentes envolvidos em micoses humanas. Acredita-se, com base em uma prevalência estimada, que 10-15% da população mundial pode ser infectada no decorrer de sua vida por dermatófitos (SIDRIM; ROCHA, 2010).

As infecções fúngicas, ao longo das últimas três décadas, vêm se tornando um sério problema de saúde pública, sendo este um grande desafio para os profissionais da saúde, tendo em vista o aumento gradual das taxas de morbidade e mortalidade de pessoas acometidas por tais infecções (BROWN, 2004). De acordo com Giacomazzi et al. (2016), aproximadamente 4 milhões de pessoas no Brasil tem infecções fúngicas a cada ano. Desse total, 2,8 milhões são infecções causadas pelo gênero *Candida* e um milhão são infecções causadas pelo gênero *Aspergillus*, que colonizam, principalmente, pacientes imunocomprometidos.

Além do aumento drástico da incidência das micoses nos últimos anos, outro grande problema é o tratamento das infecções causadas por muitos fungos visto a baixa efetividade dos medicamentos disponíveis e o desenvolvimento de cepas resistentes devido ao uso indiscriminado de terapia com antibióticos de largo espectro (REX; WALSH; ANAISSIE, 1997; MENCACCI et al., 2000; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). Esse problema é exacerbado pelas incontáveis reações adversas que esses fármacos podem apresentar. Portanto, isso tem sido motivo de preocupação e de desenvolvimento de estudos por todo o mundo em busca de novas substâncias que apresentem ação antifúngica mais potentes, seguras e eficazes (ZACCHINO, 2003; FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004; CURTIS et al., 2005; BERGAMO et al., 2015; KAHRSTROM, 2015).

Nesse sentido, é impulsionada a busca por novas fontes de substâncias com ação antifúngica, com menos efeitos indesejáveis, baixo custo, maior segurança e eficácia. Sendo tal busca orientada para o uso de plantas medicinais, seus respectivos metabólitos secundários isolados, assim como substâncias químicas de natureza sintética (VICENTINI et al., 2007; MOREIRA et al., 2010; CARMO et al., 2013; BARROS, 2014; CAVALEIRO, et al., 2015).

Compostos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol possuem inúmeras aplicações biológicas, dependendo da molécula no qual este é incorporado. Moléculas apresentando este tipo de anel apresentaram promissores efeitos biológicos como: antiasmáticos, antidiabético, agentes anti-inflamatórios, agentes antitumorais, agentes neuroprotetores, imunossuppressores, antioxidantes e agentes antimicrobianos (PACE; PIERRO, 2009; CUNHA; AGUIAR, 2015; GOBEC et al., 2015).

Num estudo desenvolvido por Tale et al. (2011), evidenciou-se uma significativa atividade antifúngica de novos derivados do 1,2,4-oxadiazol contra fungos como *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*, onde todos os compostos testados foram eficientes na inibição dos fungos, quando comparada a ação do miconazol, usado como referência, no teste.

Portanto, a avaliação do potencial antifúngico de compostos heterocíclicos, contendo o anel 1,2,4-oxadiazólico, pode significar, no futuro, uma importante alternativa terapêutica contra diferentes fungos patogênicos ao homem, que é acometido pelas mais variadas micoses, desde superficiais até profundas, nesse último caso, com risco aumentado de morte, justificando assim, este trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antifúngica de compostos heterocíclicos, contendo o anel 1,2,4-oxadiazólico sobre as leveduras *Candida tropicalis* HU-01, *Trichosporon inkin* LM-67, *Geotrichum* LM-03 e *Rhodotorula* LM-014 e os filamentosos *Aspergillus flavus* LM-27, *Aspegillus niger* LJB-01 e *Rhizopus orizae* LM-64.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar, através de uma triagem microbiológica, que compostos apresentam efeito antimicrobiano sobre leveduras e fungos filamentosos potencialmente patogênicos;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do(s) produto(s) com atividade antifúngica verificada na etapa anterior;
- ✓ Determinar a concentração fungicida mínima (CFM) a partir dos resultados da CIM.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Fungos

Os fungos são organismos de extrema importância, não somente devido a seu papel vital no ecossistema, mas também por causa da sua influência sobre os seres humanos e em atividades relacionadas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; MUELLER; SCHMIT, 2007; PFALLER, 2012; ABREU et al., 2015). Eles são utilizados na produção de alimentos, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, atuam na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação. Além disso, também são de grande valia na agricultura e na ecologia, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos (ABREU et al., 2015).

Esses microrganismos foram classificados como plantas até 1969 e, mais tarde, inseridos em um reino separado, denominado Fungi. É um reino de abundante diversidade, apresentando desde espécies de estrutura simples, que crescem como organismos unicelulares, a espécies de organização complexa, com hifas ramificadas que produzem uma notável diversidade de esporos e outras estruturas reprodutivas daí, a dificuldade de generalizar as características desse reino (ADAMS, 2004; LEME et al., 2011).

De acordo com Hawksworth (1991, 2001), estima-se que o reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhão de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta. Aproximadamente 70.000 foram descritas até hoje, estando dentre elas as causadoras de micoses em humanos, de doenças em plantas cultivadas e as de importância biotecnológica (OLIVEIRA, 2010).

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, obtendo sua alimentação a partir de matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos dessa maneira, estes microrganismos influenciam a vida do homem participando de processos desejáveis ou prejudiciais (TORTORA; FUNK; CASE, 2012). Além disso, são seres ubiqüitários, que se difundem na natureza, através de conídios ou esporos, que são estruturas de reprodução, por diversos meios, como ar, insetos, água, animais, etc (MISHRA; DUBEY, 1994; NOVAK; ALMEIDA; SANTOS, 2002).

O desenvolvimento de um fungo é influenciado por diversos fatores, dentre estes, a luminosidade, a estação do ano, a localização, a umidade relativa do ar, entre outros, sendo seu crescimento dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva (LEME et al., 2011). Fisiologicamente, se adaptam a condições insuportáveis para a maioria dos microrganismos, podendo crescer em substratos com concentrações elevadas de açúcar, já que são pouco sensíveis a altas pressões osmóticas; suportam pH entre 2,0 e 9,0, sendo que o pH considerado ótimo para a maioria das espécies está em torno de 5,6 (pH ácido). Embora, a faixa de temperatura considerada ótima para o crescimento da maioria dos microrganismos esteja entre 22 e 30°C, podem se desenvolver, também, numa ampla faixa de temperatura (PUTZKE; PUTZKE, 2002; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Os fungos podem infectar o organismo de diversas formas e a manifestação destas infecções podem ser rápidas e passar despercebidas, ou graves e por vezes letais (SOMENZI; RIBEIRO; MENEZES, 2006). A semelhança entre as célula fúngica e às hospedeira, se apresenta como um desafio na elaboração de estratégias terapêuticas específicas direcionadas aos fungos que causam essas infecções e que sejam atóxicas para o hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

Os fungos de importância médica, relacionados as micoses, são de dois tipos morfológicos: leveduras, que são unicelulares, e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares (ANVISA, 2004). No entanto, existe um terceiro grupo denominado dimórfico. Esse grupo pode apresentar uma morfologia leveduriforme ou filamentosa, variando de acordo com temperatura na qual é submetido, apresentando-se como filamentoso, quando exposto a temperatura ambiente ($26,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$), ou como levedura, na temperatura de $38 \pm 1^\circ\text{C}$ (SIDRIM; ROCHA, 2010).

O espectro das doenças fúngicas abrange desde infecções cutâneas superficiais e mucosas, que pode se manifestar por uma irritação local, a processos altamente invasivos associados a patógenos sistêmicos clássicos e oportunistas. Infecções graves tem sido reportadas com uma variedade cada vez maior de patógenos, incluindo os fungos patogênicos *Candida*, *Cryptococcus* ssp., *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus*, como também fungos filamentosos hialinos e demáceos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011; SABINO et al., 2017).

3.2 Leveduras

Denomina-se levedura um subgrupo de *Ascomycetos*, que representam uma subunidade na classificação taxonômica dos fungos e, assim como os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza (SIDRIM; ROCHA, 2010). São fungos unicelulares, tipicamente esféricos ou ovais e apresentam uma forma de divisão diferenciada, isto é, se dividem por brotamento simples, por brotamento-fissão ou por divisão binária diferenciando-se assim dos fungos filamentosos (SIDRIM; ROCHA, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Nos meios de cultura usuais para isolamento fúngico não é possível distinguir macroscopicamente a maioria das leveduras. Em geral, suas colônias se apresentam glabras, de coloração branca ou bege, de superfície lisa, pastosa ou cremosas. Além disso, as leveduras possuem padrão morfológico muito similar, isto é, tanto em parasitismo como nos isolados primários, as leveduras se apresentam arredondadas ou ovaladas, com raras exceções, não exibindo, assim, estruturas distintas relacionadas à reprodução sexuada ou assexuada. Por este motivo, para sua classificação, faz-se uso da evidenciação dos padrões bioquímicos e enzimáticos (SIDRIM; ROCHA, 2010).

As leveduras são microrganismos capazes de colonizar tanto seres humanos como animais de outras espécies sem causar-lhes danos. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio parasito-hospedeiro, ocasionam quadros infecciosos denominados leveduroses ou micoses mucocutâneas que, podem se manifestar sob a forma localizada ou disseminada (ANVISA, 2004).

Candida tropicalis, *Trichosporum inkin*, *Geotrichum* spp. e *Rhodotorulla* spp., são exemplos de leveduras usualmente envolvidas em infecções micóticas sendo a *Candida tropicalis* reconhecida como a segunda espécie mais isolada, implicada em 4% a 24% dos casos de candidemia (OLLIVIER, 2008; MENEZES, 2009). A segunda é o agente etiológico clássico de uma micose superficial estrita, a piedra branca (SIDRIM; ROCHA, 2010). Quando se trata do gênero *Geotrichum*, algumas espécies podem estar relacionadas às patologias do sistema respiratório e do trato-gastrointestinal de humanos, ocasionando infecções oportunistas (GENTE et al., 2002; HOOG et al., 2004; ALPER et al., 2011). Por último, as espécies do gênero *Rhodotorulla* spp., que frequentemente são associadas com infecções no sistema nervoso central, oculares, endocardites e peritonites (TUON; COSTA, 2008).

3.3 Filamentosos

Esses microrganismos se apresentam sob a forma multicelular, podendo ser chamados de bolores ou mofos. São constituídos de um conjunto de estruturas tubulares filamentosas, denominadas de hifas que, na maioria dos fungos filamentosos, contêm paredes cruzadas denominadas septos, que dividem as hifas em distintas unidades celulares uninucleadas (um único núcleo). Essas hifas são chamadas de hifas septadas. Em algumas poucas classes de fungos, as hifas não contêm septos e se apresentam como células longas e contínuas com muitos núcleos. Elas são chamadas de hifas cenocíticas. Quando as condições ambientais são favoráveis, as hifas crescem formando uma massa filamentosa chamada de micélio, que é visível a olho nu (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Quando se refere à identificação morfológica dos fungos filamentosos, é necessário observar as características macroscópicas e microscópicas, sendo as últimas, as que detêm uma maior importância (FAIA, 2011). Entretanto, existem determinadas características macroscópicas tais como o diâmetro da colônia, a cor, a textura, a presença ou ausência de rebordo, a rugosidade, a elevação e exsudado e a sua respectiva cor que, permitem uma identificação prévia, não conclusiva porém, não menos importante. Como exemplos pode-se citar fungos pertencentes ao gênero *Eurotium*, que formam colônias amarelas; os fungos do gênero *Trichoderma*, com rápido crescimento e colônias brancas, com formação de tufo verdes ou amarelos ao fim de uma semana de crescimento; ou ainda o reverso preto de uma colônia de um fungo pertencente ao gênero *Cladosporium* (SAMSON et al., 2010).

Segundo Abreu et al. (2015), os fungos filamentosos desempenham um importante papel na vida dos seres humanos e no ambiente e, isso se deve à sua participação na produção de alimentos, nos produtos para saúde e na reciclagem de compostos da biosfera. Além disso, também são utilizados em muitos processos industriais (na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, polióis, pigmentos, lipídios e glicolipídios).

Ao contrário das leveduras, os fungos filamentosos, normalmente, não fazem parte da microbiota normal e, portanto, o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos entretanto, também são capazes de colonizar seres humanos e animais, causando infecções fúngicas (ANVISA, 2004).

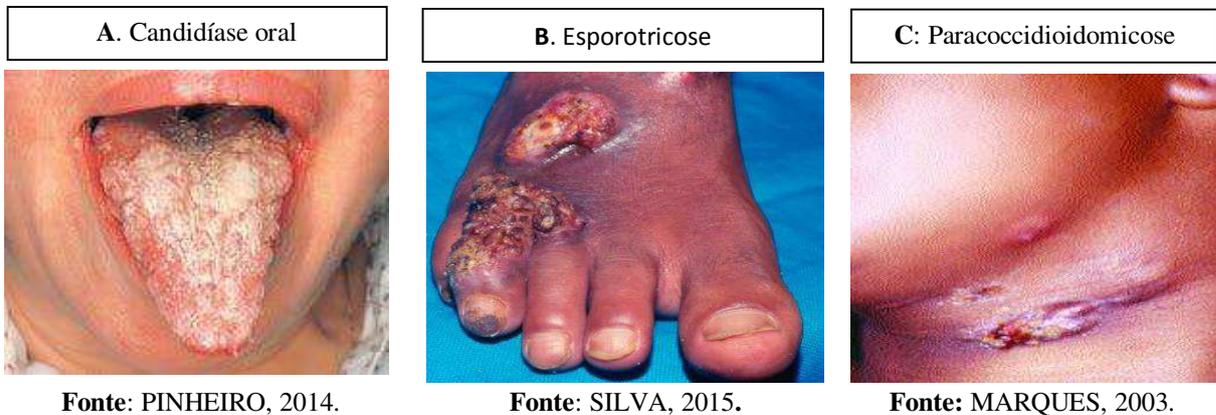
3.4 Manifestações clínicas

Denomina-se micoses um vasto espectro de infecções causadas por fungos, tanto leveduriformes como filamentosos, que acometem seres humanos e animais. As micoses geralmente são infecções crônicas, tendo em vista que os fungos crescem de forma lenta. São diversas as consequências destas infecções fúngicas nos hospedeiros sendo sua gravidade determinada pela espécie do fungo envolvida, do sítio anatômico acometido e do estado de saúde do paciente (BLANCO; GARCIA, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Geralmente, indivíduos saudáveis imunocompetentes apresentam alta resistência as infecções fúngicas apesar de serem constantemente expostos às formas infecciosas de diversos fungos da microbiota endógena ou do ambiente. Os patógenos fúngicos oportunistas, como *Candida*, *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp., somente causam infecção quando ocorrem quebra nas barreiras protetoras ou quando falhas no sistema imune do hospedeiro permitem a penetração, colonização e proliferação do microrganismo no hospedeiro. Infecções graves tem sido reportadas com uma variedade cada vez maior de patógenos, incluindo fungos como *Candida*, *Cryptococcus* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus* spp., como também fungos filamentosos hialinos e demáceos menos conhecidos. (SOMENZI; RIBEIRO; MENEZES, 2006; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

As micoses são classificadas, de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o modo de entrada no hospedeiro, em: superficiais (Figura 1 A, p. 21), localizadas na pele e anexos; subcutâneas (Figura 1 B, p. 21), acometendo pele e tecidos subcutâneos; sistêmicas ou profundas (Figura 1 C, p. 21) agredindo, principalmente, órgãos internos e vísceras, podendo atingir muitos tecidos e órgãos diferentes (SIDRIM; ROCHA, 2010; TORTORA, FUNKE; CASE, 2012).

Figura 1. Representação de Infecções fúngicas superficiais (A), subcutâneas (B), sistêmicas ou profundas (C).



Dentre estas, as infecções fúngicas superficiais são as mais comuns, afetando pele, pêlos, cabelo, as unhas, os órgãos genitais e a mucosa oral (SOMENZI; RIBEIRO; MENEZES, 2006).

As micoses não constituem doenças de notificação compulsória, dessa forma, não é possível se ter um conhecimento preciso da dimensão do problema. Evidenciando a necessidade imediata da realização periódica de estudos que forneçam uma visão mais fidedigna da frequência dessas infecções fúngicas, de seus agentes etiológicos, em razão dos aspectos socioeconômicos, geográficos e climáticos, como medida de prevenção epidemiológica (ARAÚJO et al., 2012).

3.5 Epidemiologia

Nos últimos anos, a incidência de micoses têm aumentado drasticamente e se tornado um sério problema de saúde pública, o que se deve ao crescente número de pacientes com imunodeficiências inatas ou adquiridas (REX; WALSH; ANAISSIE, 1997; MENCACCI et al., 2000), avanços na cirurgia, tratamento do câncer, tratamento de pacientes com transplante de órgãos sólidos, de medula óssea e epidemia de HIV. Outro fator que contribui é o uso crescente de terapia com antibióticos de largo espectro (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014) apresentando um grande desafio para os profissionais da saúde.

De acordo com Giacomazzi et al. (2016), aproximadamente 4 milhões de pessoas no Brasil tem infecções fúngicas a cada ano. Desse total, 2,8 milhões são infecções causadas pelo

gênero *Candida* e um milhão são infecções causadas pelo gênero *Aspergillus*, que colonizam, principalmente, pacientes imunocomprometidos em razão do uso intensivo de antibióticos ou de medicamentos imunossupressores, de doenças como o câncer e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de procedimentos invasivos como sondas e catéteres em unidades de terapia intensiva (UTI).

Existem estimativas que mostram que nos últimos anos aproximadamente 40% de todas as mortes por infecções hospitalares tenham origem fúngica (ZHANG; BECKER; CHENG, 2006). Quando se trata do ambiente hospitalar, o gênero *Candida* é o de maior importância mas, existem outras leveduras, nesse mesmo ambiente, que podem causar quadros infecciosos, dentre elas, *Pichia sp* (*Hansenula sp*), *Rhodotorula sp* e *Trichosporon sp*. Além das leveduras, os fungos filamentosos no ambiente hospitalar, também podem causar infecção em pacientes suscetíveis. O gênero *Aspergillus sp*, incluindo as espécies *Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, é o mais citado na literatura como fungo filamentoso oportunista, colonizando, especialmente, pacientes transplantados de medula óssea e neutropênicos (ANVISA, 2004).

O estudo realizado por Giacomazzi et al. (2016) demonstrou a existência de uma grande discrepância entre a ocorrência estimada de infecções causadas por fungos na população em geral, em particular entre os pacientes com estado de saúde grave e o número de infecções fúngicas notificadas ao Ministério da Saúde do Brasil. Essa ausência de dados precisos sobre a incidência de infecções fúngicas no Brasil, bem como em muitas partes do mundo, pode levar as autoridades à negligenciarem tais infecções excluindo-as do seu plano de prioridades de assistência de saúde e, conseqüentemente, as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a tais infecções serão altas.

3.6 Diagnóstico laboratorial

É cada vez mais importante não somente saber se o paciente está com infecção fúngica, como também identificar o agente etiológico da infecção para que seja estabelecida as estratégias de tratamento e acompanhamento (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011). As micoses têm o seu diagnóstico microbiológico feito através da verificação do fungo no material clínico, em preparações microscópicas, exame histopatológico e cultivos complementados por provas indiretas, tais como testes intradérmicos, pesquisa de anticorpos

séricos e de antígenos circulantes. E, soma-se a isso os diversos requisitos clínicos que, apesar de geralmente serem presumíveis, necessitando muitas vezes da confirmação em laboratório, são essenciais para que se tenha um diagnóstico definitivo (SIDRIM; ROCHA, 2010).

Assim como nos demais tipos de processos infecciosos, o diagnóstico laboratorial da infecção micótica depende diretamente da fase pré-analítica (coleta adequada do material clínico necessário e entrega ao laboratório). O material clínico a ser coletado para realizar o exame depende do tipo de micose. No caso das superficiais e cutâneas, coleta-se principalmente pelos e escamas de pele ou unha. Quando se trata de micoses subcutâneas, o material pode ser secreções, sangue e pus e, quando a micose é profunda, analisa-se materiais como urina, fezes, escarro e líquido cefalorraquidiano (SIDRIM; ROCHA, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

Dentre os inúmeros métodos existentes para o diagnóstico de infecções fúngicas, a microscopia direta é o método mais usual na grande maioria dos casos clínicos o que é justificado pela rapidez e sensibilidade do método, permitindo a visualização fúngica e, em muitas situações, sua identificação. De forma geral, o material a ser analisado é sujeito à clarificação por solução de hidróxido de potássio de 10% a 20%, acrescido de tinta Parker 51 permanente, na proporção 2:1 e aquecimento discreto. Para isto, posiciona-se o material clínico sobre a superfície de uma lâmina, adicionando em seguida uma gota de hidróxido de potássio com tinta, cobrindo-o com lamínula, aquecendo suavemente à chama e, por fim, examina-se o material ao microscópio. Outras vantagens da técnica são seu baixo custo, eficácia, reprodutibilidade, demandando, porém, profissional bem treinado (SIDRIM; ROCHA, 2010).

A cultura fúngica é, na maioria das vezes, indispensável para o diagnóstico específico da grande maioria dos fungos, sendo o meio de cultura mais utilizado o ágar Sabouraud dextrose (ASD) (SIDRIM; ROCHA, 2010). Entretanto, de acordo com Murray et al. 2011, nenhum meio de cultura por si só é suficiente para isolar todos os fungos clinicamente importantes portanto, são utilizados pelo menos dois tipos de meio, um seletivo e o outro não seletivo.

De uma maneira geral, a identificação e classificação de fungos filamentosos é feita a partir das características morfológicas, tanto macroscópicas (cor, aspecto, tamanho, relevo, pigmentação e textura da colônia e características das bordas), quanto microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos, etc), além da velocidade de crescimento que, pode ser lenta, moderada ou rápida (ANVISA, 2004; SIDRIM; ROCHA, 2010).

Em contrapartida, a identificação de fungos leveduriformes é feita, principalmente, a partir de provas bioquímicas e fisiológicas, tendo em vista que a morfologia destes fungos não apresenta muita diversidade e, portanto, não permite distinção entre espécies e, em regra, entre gêneros. A análise dos critérios bioquímicos (Quadro 1) são indispensáveis na identificação das leveduras e, assim, avalia-se a capacidade que as leveduras possuem de fazer uso de carboidratos e compostos nitrogenados como origem de carbono e nitrogênio, respectivamente (assimilação de carboidratos e nitrogênio ou auxograma) e de fermentar também alguns carboidratos (fermentação de carboidratos ou zimograma). Ademais, provas enzimáticas (Figura 2): produção de urease ou fenoloxidase pelas leveduras estudadas, podem ser utilizadas para sua detecção (SIDRIM; ROCHA, 2008).

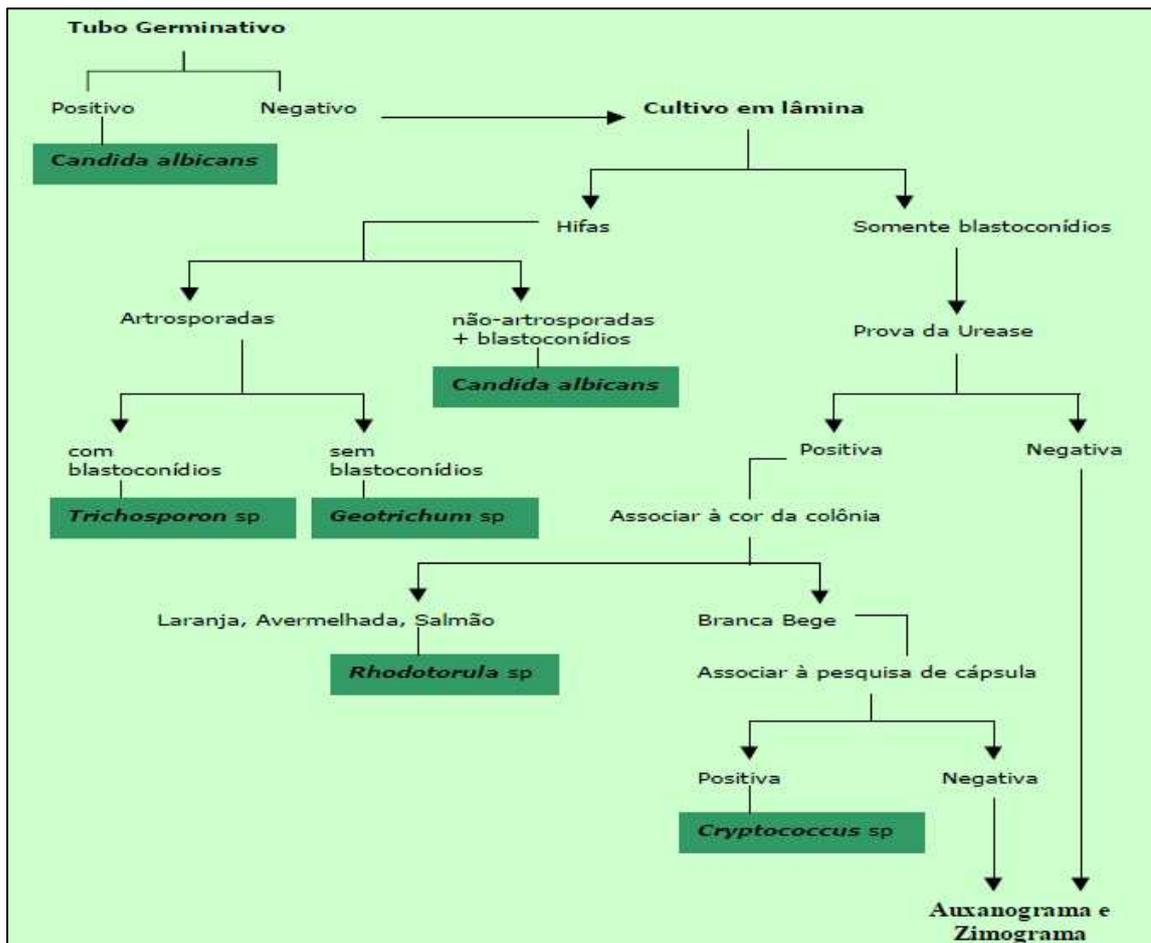
Quadro 1. Provas bioquímicas e enzimáticas para identificação das principais leveduras de interesse clínico.

Levedura	Tg	Cultivo em lâmina		Ur	Assimilação									Fermentação					
		Hifa	Ar		Sa	Ma	La	Ce	Tr	Ra	X	I	NO ₃	Gl	Sa	Ma	La	Ra	Tr
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	V
<i>C. tropicalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	-	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
<i>C. krusei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	V
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	+	+	+	-	V	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon</i>	-	+	+	V	+	+	+	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula sp</i>	-	-	-	+	+	V	-	V	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	V

Tg: tubo germinativo, **Ar:** artrósporo, **Ur:** urease, **Sa:** sacarose, **Ma:** maltose, **La :** lactose, **Ce :** celubiose, **Tr:** trealose, **Ra :** rafinose, **X :** xilose, **I :** inositol, **NO₃ :** nitrato, **Gl :** glicose, + : pos, - : neg, **V:** variável.

A identificação de leveduras específicas como *Candida albicans* e *Candida* spp., pode ser feita através de provas fisiológicas (Figura 2) comuns e simples como: prova do tubo germinativo e filimentação em cultivo em lâmina. Nestas é possível avaliar a capacidade de produção de hifas hialinas ramificadas que podem se fragmentar em esporos, chamados artroconídios. Estas hifas estão presentes nos gêneros *Geotrichum* spp. e *Trichosporon* spp. Entretanto, se a levedura apresentar hifas hialinas não fragmentadas, provavelmente essa pertence ao gênero *Candida* spp. e, se visualizadas formação de clamidósporos característicos, é *Candida albicans*. Leveduras do gênero *Rhodotorula* spp., que como em regra, exibem colônias com pigmento avermelhado ou salmão, são positivas na prova enzimática da urease, assim como outros gêneros, incluindo *Candida* spp., ainda assim, outras características podem ser utilizadas na sua identificação (ANVISA, 2004).

Figura 2. Provas fisiológicas para identificação dos principais gêneros e espécies de leveduras.

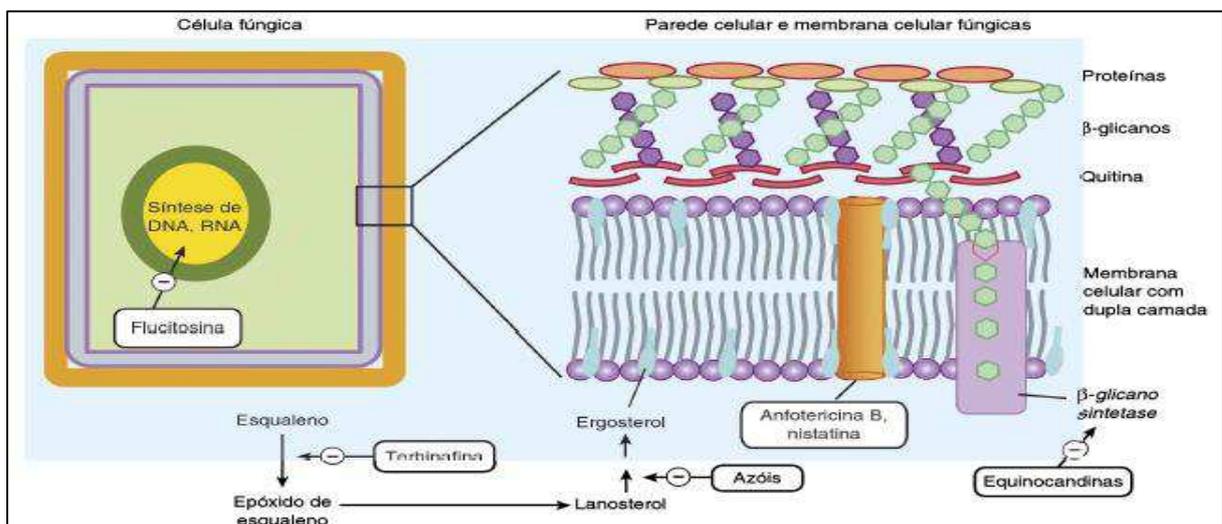


3.7 Tratamento

Os antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções fúngicas podem agir sobre o hospedeiro sendo potencialmente tóxicos para suas células tendo em vista as semelhanças existentes entre a célula fúngica e as células dos seres humanos (SIDRIM; ROCHA, 2010). O arsenal terapêutico de fármacos antifúngicos atualmente disponíveis se situam nas seguintes categorias: fármacos sistêmicos (orais ou parenterais) para infecções sistêmicas, fármacos sistêmicos orais para infecções mucocutâneas e fármacos tópicos para infecções mucocutâneas (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

De acordo com o seu modo de ação (Figura 3) os antifúngicos, de forma geral, podem ser reunidos em quatro classes: os polienos, que causam alterações ao nível da membrana fúngica por interagirem com o ergosterol, exemplos destes fármacos são a nistatina e anfotericina B e as formulações lipídicas; os inibidores da síntese do ergosterol, principal componente da membrana celular dos fungos, representantes deste grupo são os derivados azólicos, imidazólicos e triazólicos (cetoconazol, fluconazol, voriconazol) e atualmente o posaconazol; os inibidores da síntese de DNA e RNA (análogos das pirimidinas), onde se encontra inserida a flucitosina (pró-fármaco) que é convertida 5-fluorocitosina (5-FC) pelas células fúngicas e as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), as quais inibem a síntese do 1,3- β -D-glucano, principal integrante da parede celular fúngica (SANGLARD; ODDS, 2002; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Figura 3. Alvos de medicamentos antifúngicos.



Fonte: KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014.

No tratamento das infecções fúngicas deve-se considerar diversos fatores, dentre eles, o tipo de micose, o agente etiológico, o quadro do paciente e os antifúngicos que, são limitados. Porém, nos últimos anos, a terapia antifúngica tem avançado pela disponibilidade de novos agentes ativos sistematicamente e novas formulações de agentes já existentes, com comparável eficácia e menor toxicidade (SIDRIM; ROCHA, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

3.8 Resistência aos antifúngicos

A resistência antifúngica continua crescendo juntamente com a incidência de infecções que, teve um aumento mundial nos últimos anos, apesar do surgimento de novos fármacos com ação antifúngica, o que se deve, em grande parte, ao crescimento da sobrevivência da população imunodeprimida, automedicação e uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro (PFALLER, 2012).

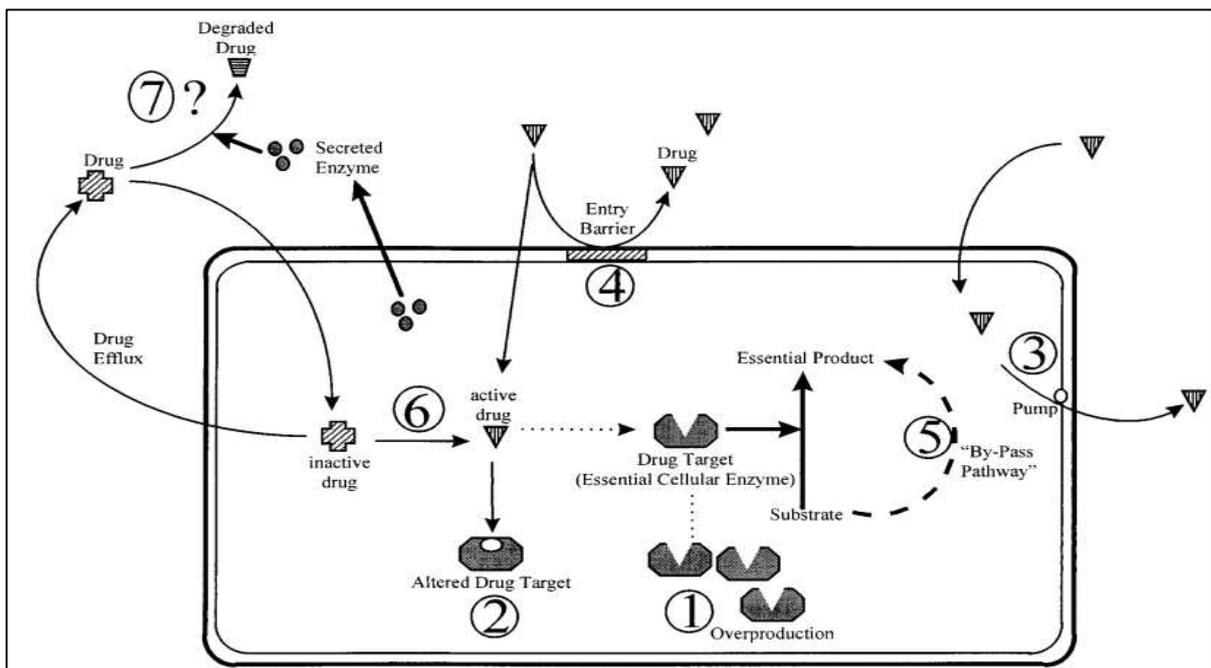
Os mecanismos de resistência antifúngica podem ser classificados como primários ou secundários e dependem das características intrínsecas ou adquiridas dos fungos patogênicos. A resistência intrínseca é um processo natural, ocorre mesmo que a espécie nunca tenha entrado em contato com a substância antifúngica. A resistência adquirida, por sua vez, desenvolve-se quando o paciente faz uso irracional de antifúngicos (RIBEIRO et al., 2004; SANTOS et al., 2009; PFALLER, 2012).

Quando se trata dos mecanismos moleculares, são diversos os envolvidos na resistência aos antifúngicos. Alguns eventos podem desencadear essa resistência como as alterações do sítio alvo das moléculas com ação terapêutica, “sobre expressão” da molécula alvo, redução da quantidade intracelular do fármaco (efluxo), extravio das proteínas transmembranares (porinas), modificações na biossíntese de esteróis, produção de enzimas fúngicas capazes de degradar as drogas administradas (Figura 4, p.28) (GHANNOUM; RICE, 1999; SANGLARD; ODDS, 2002).

De acordo com MARTINEZ-ROSSI et al. (2008), existem outros fatores que contribuem para o desenvolvimento da resistência aos antifúngicos. Dentre eles, destacam-se o aumento na desintoxicação, que ocorre por modificações na molécula com concomitante perda da ação fúngica após a entrada na célula fúngica e a adaptação por evitamento, que se caracteriza pela adaptação do metabolismo do fungo de modo que o local bloqueado não seja

utilizado. Além disso, vale ressaltar que a capacidade de produção de biofilmes nas superfícies, pelos fungos patogênicos representam uma possível barreira à eficiente penetração dos fármacos com ação antifúngica e, portanto, é vista como outra possibilidade para o surgimento de resistência fúngica (SANGLARD et al., 2003).

Figura 4. Mecanismos moleculares pelos quais a célula microbiana podem desenvolver resistência.



(1) “Sobre expressão” da enzima-alvo, de forma que o fármaco não impossibilita a reação bioquímica por completo; (2) alteração do alvo do fármaco para que esse não consiga se ligar; (3) a partir de uma bomba de efluxo o fármaco é expulso; (4) impedimento da entrada do fármaco na membrana celular/ nível da parede celular, (5) a célula tem um caminho de desvio que compensa a perda de função da inibição em razão da atividade do fármaco; (6) inibição de ‘enzimas’ com ação conversora de fármacos inativos nas suas formas ativa; (7) enzimas com ação de degradação de fármaco são secretadas pela célula para o meio extracelular.

Fonte: GRANNOUM; RICE, 1999.

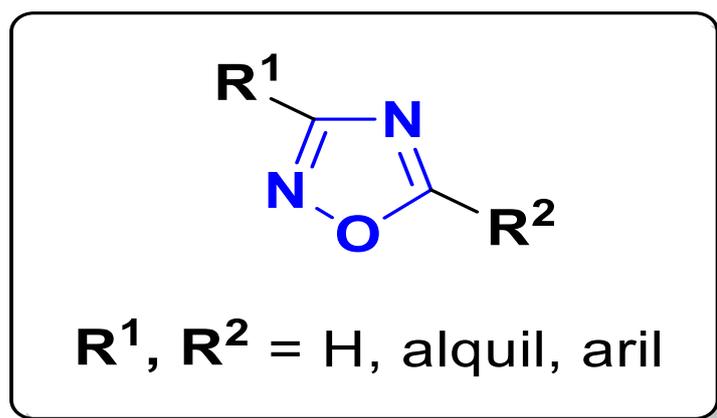
A compreensão dos meios responsáveis pela conferência aos fungos de resistência são essenciais para o desenvolvimento de modificações estruturais nos antifúngicos disponíveis no mercado (PERES et al., 2010). Portanto, evidencia-se a urgente necessidade de se introduzir novos agentes antifúngicos no arsenal terapêutico disponível, assim como, de estratégias resolutivas frente a resistência fúngica.

3.9 Compostos heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol

A maioria dos antifúngicos clinicamente utilizados, tem vários inconvenientes em termos de toxicidade, eficácia e custo, e sua utilização frequentemente leva ao aparecimento de espécies resistentes. Assim, existe uma grande demanda por novas estratégias terapêuticas, a partir de produtos de origem natural ou sintética, visando melhores efeitos farmacológicos, toxicidade seletiva e menos efeitos colaterais (ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2007; MOHAMMED; RAVISHANKAR, 2016; SANCHES-MALDONATO; SCHIEBER; GANZLE, 2016; GHANNOUM; SEVIN; SARKANY, 2016).

Compostos contendo o anel 1,2,4-oxadiazólico (Figura 5) possuem inúmeras aplicações biológicas, dependendo da molécula no qual este é incorporado. A literatura descreve inúmeros exemplos de compostos que apresentam suas propriedades físico-químicas ou biológicas melhoradas quando este anel heterocíclico foi incorporado em suas estruturas. Além disso, inúmeras moléculas contendo este anel apresentaram vários efeitos biológicos como: antiasmáticos, antidiabético, agentes anti-inflamatórios, agentes antitumorais, agentes neuroprotetores (contra doenças de Parkinson e Alzheimer), imunossuppressores, antioxidantes e agentes antimicrobianos (PACE; PIERRO, 2009; GOBEC et al., 2015).

Figura 5. Estrutura do anel 1,2,4-oxadiazólico



Fonte: Pesquisador, 2017.

No que diz respeito a atividade antimicrobiana, compostos que apresentam em sua estrutura o anel 1,2,4-oxadiazol demonstraram atividade contra micobactérias maior que o composto de referência pirazinamida. Outro exemplo disso, são substâncias triazólicas e

tetrazólicas com tal anel, que tiveram suas atividades aumentadas em dezesseis vezes contra linhagens de bactérias resistentes (GEZGINCI; MARTIN; FRANZBLAU, 2001; JO et al., 2004).

Em um estudo desenvolvido por Tale et al. (2011), evidenciou-se significativa atividade antifúngica de novos derivados do 1,2,4-oxadiazol contra fungos como *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*, onde todos os compostos testados foram eficientes na inibição dos fungos, quando comparada a ação do miconazol, usado como referência, no teste.

4. METODOLOGIA

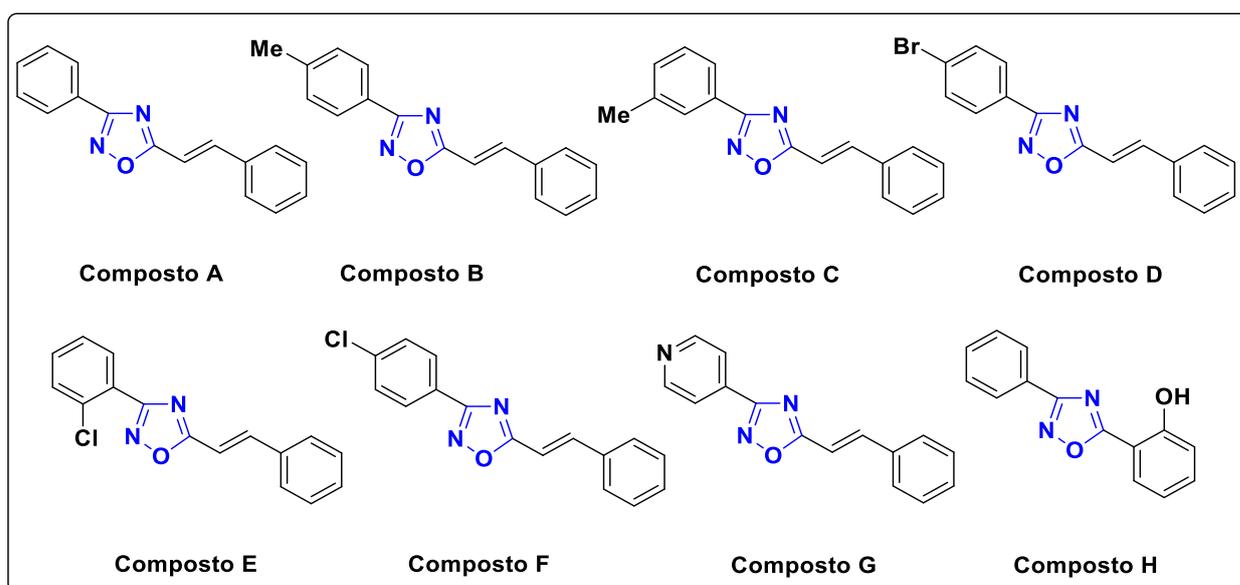
4.1 Local de trabalho

Os testes de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia e Microbiologia do Centro de Educação e Saúde (J-11), da Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité/PB.

4.2 Produtos sintéticos

Os compostos, cujas as atividades antifúngicas foram averiguadas, são heterocíclicos que apresentam em comum o anel 1,2,4-oxadiazol, sendo elas: (*E*)-3-fenil-5-estiril-1,2,4-oxadiazol (Composto A); (*E*)-5-estiril-3-(*p*-toluil)-1,2,4-oxadiazol (Composto B); (*E*)-5-estiril-3-(*m*-toluil)-1,2,4-oxadiazol (Composto C); (*E*)-3-(4-bromofenil)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol (Composto D); (*E*)-3-(2-clorofenil)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol (Composto E); (*E*)-3-(4-clorofenil)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol (Composto F); (*E*)-3-(4-piridin-1-il)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol (Composto G) e (*E*)-3-(2-hidroxifenil)-5-fenil-1,2,4-oxadiazol (Composto H) (Figura 6).

Figura 6. Estrutura dos compostos 1,2,4-oxadiazólicos avaliados no teste da atividade antifúngica



Fonte: Pesquisador, 2017.

As substâncias citadas foram sintetizadas e cedidas a partir do trabalho de mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia - UFCG/CES do aluno Erick Caique Santos Costa, início da pesquisa 2015, título Síntese e Atividade Biológica de Oxadiazóis com Arquitetura Molecular Semelhante a (*R*)-Goniotalamina, sob orientação do professor Juliano Carlo Rufino de Freitas.

Os produtos permaneceram armazenados em um frasco âmbar e mantidos em temperatura ambiente no Laboratório de Microbiologia. As soluções, nas diferentes concentrações, foram preparadas no momento de execução dos ensaios, dissolvendo-se, quando necessário, os produtos em acetato de etila.

4.3 Produto controle

Cetoconazol (antifúngico comercial adquirido da Sigma-Aldrich®) foi utilizado para o controle positivo nos teste de atividade antifúngica. As soluções também foram preparadas no momento de execução dos testes.

4.4 Fungos

Os fungos que foram utilizados nos ensaios de atividade biológica são provenientes de isolados clínicos e foram cedidas pelo laboratório de Microbiologia (J11) do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) ou cedidas pela professora Edeltrudes de Oliveira Lima do laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). E consistiram nas seguintes espécies:

- ✓ Leveduras: *Candida tropicalis* HU-01, *Trichosporon inkin* LM-67, *Geotrichum* LM-03 e *Rhodotorula* LM-014.
- ✓ Filamentosos: *Aspergillus flavus* LM-27, *Aspergillus niger* LJB-01 e *Rhizopus orizae* LM-64.

4.5 Meios de cultura

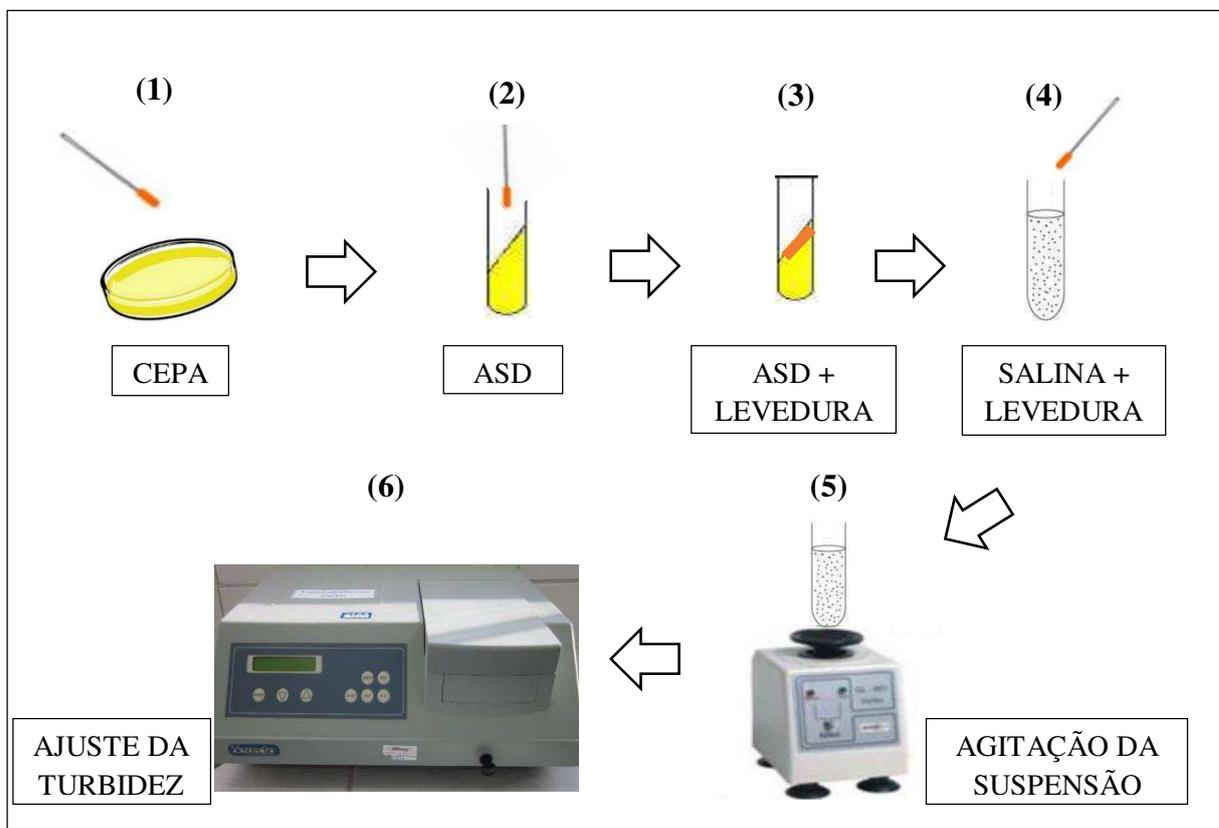
Os meios de cultura necessários aos ensaios microbiológicos foram os meios ágar Sabouraud dextrose (ASD) e caldo Sabouraud dextrose (CSD), preparados de acordo com as instruções do fabricante. Para conservação das cepas e preparação do inóculo foi utilizado o

ágar Sabouraud dextrose (ASD), também adquirido da Sigma Aldrich®. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

4.6 Inóculo

Na preparação do inóculo dos fungos leveduriformes (Figura 7), os isolados foram primeiramente cultivados em meio ASD acrescido do antibiótico cloranfenicol, com a finalidade de inibir o crescimento de bactérias que, porventura, estejam contaminando o meio, inclinado a 35°C por 24 h (*overnight*). Inicialmente preparadas suspensões dos microrganismos em tubos contendo salina estéril (NaCl a 0,9%). As suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex Biomixer e, após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada, utilizando o aparelho Espectrofotômetro Bel Photonics SP 1102, para a transmitância de 70%, no comprimento de onda de 530 nm, correspondendo, aproximadamente a 10^6 UFC/mL.

Figura 7. Representação esquemática da preparação do inóculo dos fungos leveduriformes

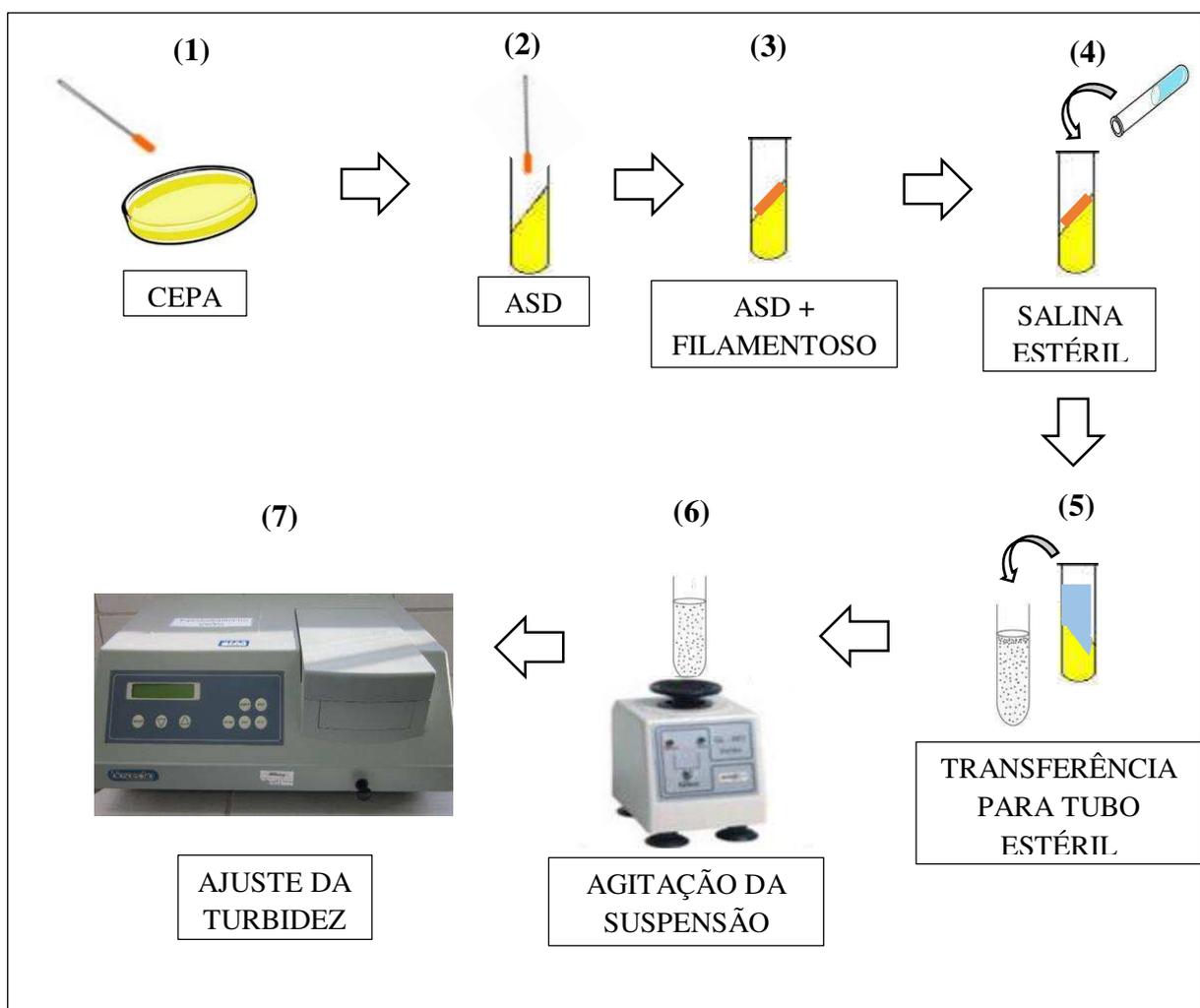


Fonte: Pesquisador, 2017.

Para preparação do inóculo dos fungos filamentosos (Figura 8), primeiramente os isolados foram cultivados em meio ASD com cloranfenicol a 28°C por 7-15 dias, para induzir a quantidade necessária de conídios. As colônias fúngicas recentes foram devidamente cobertas com salina estéril (NaCl 0,9%), e as suspensões feitas por suaves agitações. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubos de ensaio esterilizados.

Assim como as suspensões dos fungos leveduriformes, todas as suspensões dos fungos filamentosos também foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex Biomixer e, após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada, utilizando o aparelho Espectrofotômetro Bel Photonics SP 1102, para a transmitância de 70%, no comprimento de onda de 530 nm, correspondendo, aproximadamente a 10^6 UFC/mL.

Figura 8. Representação esquemática da preparação do inóculo dos fungos filamentosos



4.7 Atividade antifúngica *in vitro*

4.7.1 Triagem microbiológica

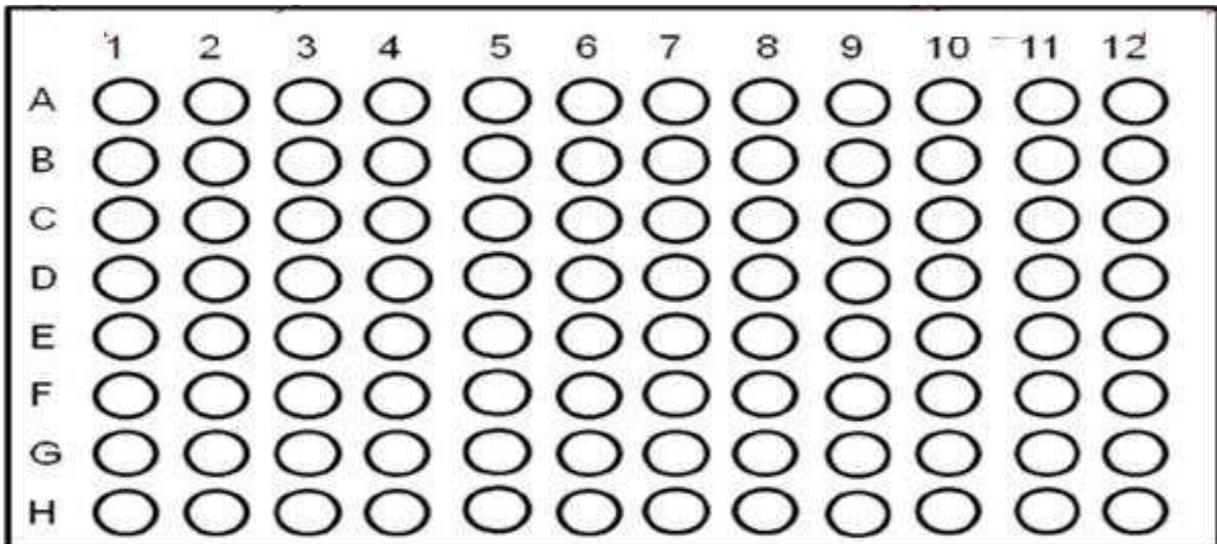
A triagem microbiológica para avaliação do potencial antifúngico dos produtos foi realizada com base na técnica de difusão em meio sólido com discos de papel de filtro (HADACEK; GREGER, 2000). Em cada placa de Petri (90 x 15 mm) estéril, adicionou-se 20 mL do meio ASD fundido a 50°C. Após solidificação do meio, esse teve toda a sua extensão semeada com auxílio de swab. Para tanto, fez-se estrias com movimentos em ziguezague longitudinais e transversais. Em seguida, discos papel de filtro (Sensiobiodisc do Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda – CECON/SP) embebido com 20 µL do produto teste, foram depositados na superfície do meio de cultura ao centro da placa. Todo o sistema ficou incubado a 36°C por 24/48 horas no caso de leveduras e a 28°C por 7-15 dias para filamentosos.

Os ensaios são realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos halos de inibição obtidos. A atividade antifúngica é considerada positiva quando a média dos halos de inibição for superior ou igual a 10 mm de diâmetro.

4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição seriada, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” (Figura 9, p.36) e em triplicata, apenas com aqueles produtos que apresentaram atividade antifúngica na triagem microbiológica (SOUZA et al., 2007; MOREIRA et al., 2010). Essa etapa foi determinada conforme recomendações da norma técnica M38-A e M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ambas publicadas em 2002.

Figura 9. Esquema da microplaca utilizada na diluição de compostos heterocíclicos que apresentam em comum o anel 1,2,4-oxadiazol.



Fonte: Pesquisador, 2017

Em cada orifício da placa de microdiluição foram adicionados 100 μL da substância teste diluída no caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado, em concentrações variando de 4000 $\mu\text{g/mL}$ a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). Em seguida, 10 μL da suspensão fúngica foram adicionados a cada orifício da placa contendo o meio com o produto (Figura 11). As diluições foram realizadas nas colunas de 1 a 10.

Figura 10. Adição das substâncias teste diluídas aos orifícios da placa de microdiluição contendo o meio.



Fonte: Pesquisador, 2017.

Figura 11. Adição das suspensões fúngicas aos orifícios contendo o meio e as substâncias teste.



Fonte: Pesquisador, 2017.

Na coluna 11 foi realizado o mesmo experimento com o cetoconazol que foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído no meio de cultura numa concentração de 16 a 0,03 µg/mL. Paralelamente, na coluna 12, foi realizado o controle de viabilidade dos microrganismos (controle positivo) colocando-se 100 µL do caldo Sabouraud duplamente concentrado, sem os produtos teste, juntamente com os microrganismos nas cavidades de F a H. Nas cavidades de A a C, da mesma coluna, foi realizado o controle negativo adicionando somente o caldo estéril. Todas as placas foram seladas e incubadas 36°C para leveduras por 24/48 horas e a 28°C para os filamentosos por 7-15 dias.

Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade, comparando com o controle (ausente de drogas). Define-se a CIM para os produtos testados como a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento fúngico verificado nos orifícios. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados.

4.7.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após realização da microdiluição para determinação da CIM dos produtos, alíquotas de 20 µL dos produtos presentes nas cavidades onde não apresentaram crescimento fúngico foram semeadas em ASD, desprovidas de qualquer antifúngico. Todo o sistema foi incubado em seguida, conforme o tipo de microrganismo. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica das CFM obtidas nos dois ensaios. A CFM foi definida como a menor concentração dos produtos testados onde a cepa teste não mostrou capacidade de crescimento maior que três unidades formadoras de colônia (UFC), quando inoculada no meio de cultura isento de antifúngicos (RASOOLI; ABYANEH, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após o teste de triagem microbiológica para avaliação da atividade antifúngica dos compostos heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol sobre as cepas de *Candida tropicalis*, *Trichosporon inkin*, *Geotrichum* spp. e *Rhodotorula* spp. evidenciaram resistência fúngica nas condições experimentais utilizadas, uma vez que não foram obtidos halos de inibição (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do *screening* da atividade antifúngica dos compostos heterocíclicos que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol a partir do método de difusão em disco.

FUNGOS	ESPÉCIE	HALO DE INIBIÇÃO
LEVEDURIFORMES	<i>Candida tropicalis</i>	Ausente
	<i>Geotrichum</i> spp.	Ausente
	<i>Rhodotorula</i> spp.	Ausente
	<i>Trichosporon inkin</i>	Ausente

A inexistência de estudos na literatura científica que avaliem a atividade antifúngica a partir do método de difusão em disco, desses heterocíclicos contendo anel 1,2,4-oxadiazol frente à essas mesmas espécies fúngicas impossibilita a comparação de dados com outras pesquisas que avaliaram heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol. Contudo, a atividade antifúngica tem sido relatada para outros heterocíclicos, contendo o anel 1,2,4-oxadiazol, a exemplo do trabalho de Krishna et al. (2015), os quais realizaram a síntese de derivados do 1,2,4 – oxadiazol análogos da cumarina e, alguns dos produtos obtidos apresentaram atividade antifúngica, utilizando o método de difusão em disco, frente as cepas filamentosas de *Aspergillus terreus* e *Rhizoctonia solani*.

Diante do resultado obtido e tendo em vista que o método da difusão em meio sólido fornece informação qualitativa porém, profícua, para estabelecer a sensibilidade de microrganismos aos compostos heterocíclicos, que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol, optou-se por não realizar tal método frente as cepas filamentosas.

Daí, utilizou-se a técnica da microdiluição para verificar tanto a sensibilidade das cepas fungicas leveduriformes, quanto dos filamentosos. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) fornece informações quantitativas quanto a sensibilidade de microrganismos aos compostos heterocíclicos, que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol, determinando-se assim, a menor quantidade desses compostos necessária para inibir o crescimento dos microrganismos-teste. A CIM de tais substâncias foi determinada utilizando-se um total de sete cepas sendo elas, quatro leveduriformes e três filamentosas (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima dos compostos heterocíclicos que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol em fungos leveduriformes e filamentosos.

ESPÉCIE FÚNGICA	Compostos Heterocíclicos (µg/mL)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Geotrichum spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichosporon inkin</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspegillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizopus orizae</i> LM-64	4000	4000	4000	4000	4000	4000	1000	4000

Substâncias testadas: [A]: (E)-3-fenil-5-estiril-1,2,4-oxadiazol; [B]: (E)-5-estiril-3-(p-toluil)-1,2,4-oxadiazol; [C]: (E)-5-estiril-3-(m-toluil)-1,2,4-oxadiazol; [D]: (E)-3-(4-bromofenil)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol; [E]: (E)-3-(2-clorofenil)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol; [F]: (E)-3-(4-clorofenil)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol; [G]: (E)-3-(4-piridin-1-il)-5-estiril-1,2,4-oxadiazol; [H]: (E)-3-(2-hidroxifenil)-5-fenil-1,2,4-oxadiazol. [+]: crescimento fúngico.

De acordo com a tabela acima, os compostos heterocíclicos, de A a H, que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol apresentaram atividade antifúngica somente contra o fungo filamentoso *Rhizopus orizae* LM-64 com CIM igual a 1000 µg/mL para a substância G e de 4000 µg/mL para as demais substâncias. Segundo Houghton e colaboradores (2007), substâncias que

apresentam valores de CIM entre 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, são consideradas de baixa atividade e, substâncias com CIM superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$, são consideradas inativas, portanto, pode-se inferir que a substância G tem baixa atividade e que as demais substâncias são inativas. Em contra partida, Srivastava et al. (2003) avaliando a atividade antifúngica de cinco substâncias que também contém o anel 1,2,4-oxadiazol, perceberam que estes demonstraram possuir atividade contra algumas bactérias e contra a levedura *Candida albicans*, com a CIM variando entre 0,2 a 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

De posse da CIM, determinou-se a Concentração Fungicida Mínima (CFM) para os compostos de A a H frente a cepa do fungo filamentosso *Rhizopus orizae* LM-64 (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da determinação da Concentração Fungicida Mínima dos compostos heterocíclicos que possuem o anel 1,2,4-oxadiazol contra o fungo filamentosso *Rhizopus orizae* LM-64.

SUBSTÂNCIAS	CFM($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Rhizopus orizae</i> LM-64	
	INIBITÓRIA	FUNGICIDA
A	4000	+
B	4000	4000
C	4000	4000
D	4000	4000
E	4000	4000
F	4000	4000
G	1000	+
H	4000	4000

De acordo com a tabela acima, os compostos A e G apresentaram apenas atividade inibitória e, as demais substâncias apresentaram atividade inibitória e fungicida com CIM e

CFM de 4000 µg/mL. Em contrapartida, os compostos da classe dos 2-tiona-1,3,4-oxadiazóis, avaliados por Meira (2015), demonstraram melhores resultados, tendo em vista que a substância nomeada por 2-(3-metil-5-trifluormetil-1*H*-pirazol-1-il)-5-(2-tiona-3*H*-1,3,4-oxadiazol-5-il)-piridina apresentou CFM de 31,25 µg/mL frente as cepas de *Trichophyton mentagrophyte* e *Trichophyton rubrum* e, o composto 2-(3-fenil-5-trifluormetil-1*H*-pirazol-1-il)-5-(2-tiona-3*H*-1,3,4-oxadiazol-5-il)-piridina foi fungicida para os dermatófitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophyte* e *Trichophyton rubrum* com CFM de 7,81 µg/mL.

É notável que os resultados encontrados na literatura e a atividade antimicrobiana dos compostos avaliados são conflitantes portanto, é importante enfatizar que qualquer mudança na cadeia lateral, em qualquer posição do anel oxadiazólico, é capaz de influenciar no efeito antimicrobiano dessas substâncias.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que esses compostos heterocíclicos que contém o anel 1,2,4-oxadiazólico, nestas condições experimentais, não apresentaram atividade antifúngica frente as leveduras *Candida tropicalis*, *Trichosporon inkin*, *Geotrichum spp.* e *Rhodotorula spp.* e os filamentosos *Aspergillus flavus* e *Aspegillus niger* e, apresentaram baixa atividade frente a cepa filamentosa *Rhizopus orizae* LM-64.

E, ainda que constatada a resistência fúngica a alguns dos compostos testados, ou a baixa atividade dos mesmos, este resultado contribui para o conhecimento da potencialidade terapêutica dessa classe de compostos. Além disso, vale ressaltar o pioneirismo desse trabalho, tendo em vista que este é o primeiro relato da atividade antifúngica desse grupo de compostos heterocíclicos que contém o anel 1,2,4-oxadiazólico.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc Online**, Madrid, v. 7, p. 116-145, 2007.

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**, v.12, n.1, p. 55-59, 2015.

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Modulo VII. 2004. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004>. Acesso em: 03 Set. 2017.

ALPER I.; FRENETTE M.; LABRIE, S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum*. **Fungal Biology**, v.115, p.1259–1269, 2011.

ARAÚJO, S. M.; FONTES, C. J. F.; JÚNIOR, D. P. L.; HAHN, R. C. Fungal agents in different anatomical sites in public health services in Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 5-10, 2012.

BARROS, R. P.C. Identificação de linhagens de *Candida sp.* e perfil de sensibilidade a antifúngicos convencionais e de origem vegetal. 2014. 81 f. TCC (Monografia apresentada ao curso de Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.

BERGAMO, V. Z.; DONATO, R. K.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. J. Z.; ORTEGA, G. G.; SCHREKKER, H. S.; FUENTEFRIA, A. M. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n.1, p. 66-71, 2015.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. New Antifungic Drugs: A review. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 159-172, 2004.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. L. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1, p. 47-70, 2008.

BROWN, J. M. Fungal infections in bone marrow transplant patients. **Current opinion in infectious diseases**, v. 17, n. 4, p. 347-352, 2004.

CARMO, E. S.; CAVALCANTE, N. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; GAYOSO, C. W. Tratamento de pitiríase versicolor com aplicação tópica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf - estudo terapêutico piloto. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 381-385, 2013.

CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M-J.; HRIMPENG, K.; PINTO, J.; PINTO, E. Antifungal activity of the essential oil of *Angelica major* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Jornal of Natural Medicines**, v. 69, n. 2, p. 241-248, 2015.

CUNHA, F. S.; AGUIAR, A. P. Síntese e Bioatividade de 1,2,4-oxadiazóis. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p.2509-2530, 2015.

CURTIS, L.; CONROY, L.; COLI, S.; BAKER, K.; OUR, C.H.; HERSHOW, R.; NORLOCK-CRUZ, F.; SCHEFF, P. *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. **J. Hosp. Inf.**, v.59, n.3, p.188-196, 2005.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FAIA, A. M. Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. 2011. 41 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Farmacologia clínica**. Fundamentos da terapêutica racional. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, p. 439-440.

GENTE, S.; DESMASURES, N.; PANOFF, J.M.; GUÉGUEN, M. Genetic diversity among *Geotrichum candidum* strains from various substrates studied using RAM and RAPD-PCR.

Journal of Applied Microbiology, v. 92, p. 491–501, 2002.

GEZGINCI, M.H.; MARTIN, A.R.; FRANZBLAU, S.G. Antimycobacterial activity of substituted isosteres of pyridine- and pyrazinecarboxylic acids. 2.

Journal of Medicinal Chemistry, v. 44, n. 10, p. 1560–1563, 2001.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A.; DENNING, D. W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145-150, 2016.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GHANNOUM, M.; SEVIN, K.; SARKANY, M. Amorolfine 5% Nail Lacquer Exhibits Potent Antifungal Activity Compared to Three Acid-Based Devices Indicated for the Treatment of Onychomycosis: An *in vitro* Nail Penetration Assay. **Dermatol Ther**, v. 6, n. 1, p. 69-75, 2016.

GOBEC, M.; TOMASIC, T.; MARKOVIC, T.; MLINARIC-RASCAN, I.; DOLENC, M. S.; JAKOPIN, Z. Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1,2,4-oxadiazole analogs of resveratrol. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, n. 1, p. 200-207, 2015.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological research**, v.95, n.6, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological research**, v. 105, n.12, p. 1422-1232, 2001.

HOOG, G.S.; SMITH, M.T. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v.50, p. 489–515, 2004.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

JO, Y. W.; IM, W. B.; RHEE, J. K.; SHIM, M. J.; KIM, W. B.; CHOI, E. C. Synthesis and antibacterial activity of oxazolidinones containing pyridine substituted with heteroaromatic ring. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 5909–5915, 2004.

KAHRSTROM, C.T. Resistance is costly for *Candida*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 189, 2015. 18.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12^a edição. AMGH Editora Ltda. Porto Alegre, 2014.

KRISHNA, C.; BHARGAVI, M. V.; RAO, C. P.; KRUPADANAM, G. L. D. Synthesis and antimicrobial assesment of novel coumarins featuring 1,2,4-oxadiazole. **Medicinal Chemistry Researach**, v. 24, p. 3743-3751, 2015.

LEME, F. C. O.; NEGREIROS, M. M. B.; KOGA, F. A.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; HADDAD JUNIOR, V. Evaluation of pathogenic fungi occurrence in traumatogenic structures of freshwater fish. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 182-185, 2011.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **Anais brasileiros de dermatologia**, p. 135-146, 2003. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/29967/S036505962003000200002.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**. v. 166, p. 369-3, 2008.

MEIRA, S. C. Síntese e bioatividade de sistemas pirazolil-piridínicos poli-heterocíclicos trialometil substituídos. 2015. 272 f. Tese (Doutorado em Química pelo programa de pós-graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; BISTINI, F.; ROMANI, L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 235-251, 2000.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 354-355, 2009.

MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1001–1005, 1994.

MOHAMMED, A.; RAVISHANKAR, R.V. Antifungal activity of novel indole derivative from endophytic bacteria *Pantoea ananatis* 4G-9 against *Mycosphaerella musicola*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 476-491, 2016.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; WANDERLEY, P. A.; CARMO, E. S.; SOUZA, E. L. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 28-33, 2010.

MUELLER, G. M.; SCHIMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. **Biodiversity and Conservation**. v.16, n.1, p.1-5, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2011.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J.A. G.; SANTOS, M. J. S. Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n.3, p.197-201, 2002.

OLIVEIRA, R. L. Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos. 2010. 67 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – AM, 2010.

OLLIVIER, M. D.; BRETAGNE, S.; BERNEDE, C.; ROBERT, V.; RAOUX, D.; CHACHATY, E. FORGET, E.; LACOIX, C.; DROMER, F. Clonal population of flucytosine- Resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 557-565, 2008.

PACE, A.; PIERRO, P. The new era of 1,2,4-oxadiazoles. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 4337-4348, 2009.

PERES, N. T. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, S3-13, 2012.

PINHEIRO, P. **Fotos de Candidíase oral**. M.D Saúde. 17/04/2014. Disponível em: <
<http://www.mdsaude.com/2008/08/fotos-candidiase.html> >. Acesso em: 12 ago. 2017.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos – volume 2**. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 2002.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

REX, J. H.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Fungal infections in iatrogenically compromised hosts. **Advances in internal medicine**, v. 43, p. 321-371, 1997.

RIBEIRO, E. L.; MIRIAM, C.; FERREIRA, W. M.; MEIRA, S.; NAVES, P. L. F.;
GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, C.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S.; NAVES, F. Aspectos das

leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, n. 3, p. 106-128, 2004.

SABINO, R.; VERÍSSIMO, C.; BRANDÃO, J.; MARTINS, C.; ALVES, D.; PAIS, C.; DENNING, D. W. Serious fungal infections in Portugal. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, p. 1-8, 2017.

SANCHES-MALDONATO, A.F.; SCHIEBER, A.; GANZLE, M.G. Antifungal activity of secondary plant metabolites from potatoes (*Solanum tuberosum* L.): Glycoalkaloids and phenolic acids show synergistic effects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 955-965, 2016.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, n. 02, p. 74-78, 2003.

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

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. Food and Indoor Fungi. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**. Utrecht, Netherlands. Vol. 2, 2010. 390 p.

SANTOS, L. S.; BERNARDES, R. C.; MAGALHÃES, L. M.; SIQUEIRA, F. F.; KHOURI, S. Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidúrias hospitalares aos antifúngicos convencionais. XIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (Universidade do Vale do Paraíba), 2009.

SCHAECHTER, M.; ENGLERBERG, N. C. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 664 p.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, K. P. **Grave doença fúngica que ataca principalmente gatos e seres humanos está descontrolada e a vigilância sanitária já fala em epidemia no Rio de Janeiro.** Agosto de 2015. Disponível em: <http://diariodebiologia.com/2015/08/grave-doenca-fungica-de-gatos-esta-sendo-transmitida-para-seres-humanos-e-a-vigilancia-sanitaria-ja-fala-em-epidemia-no-rio-de-janeiro/>. Acesso em: 10 ago. 2017.

SOMENZI, C. C.; RIBEIRO, T. S.; MENEZES, S. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. **NewsLab**. 77. ed., p. 106-118, 2006.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18 n. 5, p. 409–413, 2007.

SRIVASTAVA, R. M.; LIMA, A. A.; VIANA, O. S.; SILVA, M. J. C.; CATANHO, M. T. J. A.; MORAIS, J. O. F. Antiinflammatory Property of 3-Aryl-5-(n-propyl)-1,2,4-oxadiazoles and Antimicrobial Property of 3-Aryl-5-(n-propyl)-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoles: Their Syntheses and Spectroscopic Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p.1821-1827, 2003.

TALE, R.H.; RODGE, A. H.; KECHE, A. P.; HATNAPURE, G. D.; PADOLE, P. R.; GAIKWAD, G. S.; TURKAR, S. S. Synthesis and anti-bacterial, anti-fungal activity of novel 1,2,4-oxadiazole. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 496-505, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10^a. ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2012.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 3, p. 135-140, 2008.

VICENTINI, C.B.; ROMAGNOLI, C.; ANDREOTTI, E.; MARES, D. Synthetic pyrazole derivatives as growth inhibitors of some phytopathogenic fungi. **J. Agricul. Food Chem.**, v. 55, n. 25, p. 10331–10338, 2007.

ZACCHINO, S. **Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos**. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, p. 435-479, 2001.

ZHANG, W.; BECKER, D.; CHENG, Q. Recent Pat. Anti-Infect. **Drug Discovery**, v. 3, n.1, p. 224, 2006.

ANEXOS

ANEXO A: Certificado do trabalho apresentado no 44º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas



ANEXO B: Certificado do trabalho apresentado no I Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas

