

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da atividade antifúngica de derivados de carboidratos
frente a espécies de *Candida*

Paula Reginatto

Porto Alegre, Junho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da atividade antifúngica de derivados de carboidratos
frente a espécies de *Candida*

Paula Reginatto

Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Orientador

Me. Bruna Pippi

Co-orientadora

Porto Alegre, Junho de 2016.

Local de trabalho

Os experimentos e avaliações microbiológicas foram realizados nas dependências do Laboratório de Micologia Aplicada, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As substâncias testadas pertencem à quimioteca do Prof. Dr. Ricardo José Alves, do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade, meu orientador, pela confiança em mim depositada ao me convidar para participar de seu projeto de pesquisa, pela oportunidade e pelo apoio dedicado, pela amizade, incentivo e ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa, por todo apoio e suporte dispensados.

Agradeço à minha co-orientadora, Me. Bruna Pippi, por me receber de “braços abertos” no laboratório, pela amizade e por ter me ensinado muito. Agradeço por toda paciência, atenção, tempo, apoio e dedicação, pelos dias árduos de experimento que passamos juntas, pelas risadas e lanches, pelo carinho e por todo incentivo.

À banca avaliadora: o Prof. Dr. Gustavo Silveira e a Me. Daiane Flores Dalla Lana, pelo seu tempo e suas contribuições.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, por terem me recebido com tanto carinho, por me acolherem de imediato. Além de pessoas maravilhosas, são companheiras de trabalho incríveis, que me deram muito suporte intelectual e pessoal, nessa caminhada.

Aos demais professores, colegas e funcionários desta Universidade, que participaram direta e indiretamente. Aos amigos que fiz nesta jornada da graduação, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e familiares, que mesmo à distância, sempre me incentivaram à seguir meus sonhos.

Agradeço aos meus pais, Cleuza e Ademir, por todo amor, carinho, apoio e incentivo, sem vocês nada disso seria possível. Sempre apoiaram meus sonhos, me incentivaram a lutar por meus objetivos e nunca desistir.

Ao Rafael Gonzatti, por estar sempre ao meu lado me ajudando e me dando força, por ter tanta paciência comigo e por compreender meus momentos.

Eu deixo aqui minha eterna gratidão a todos!

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

Resumo

Desde o final da década de 60, quando terapias antibacterianas foram desenvolvidas, observou-se um aumento drástico das infecções fúngicas. Hoje, elas representam um problema de saúde pública mundial e a resistência aos antifúngicos é uma das principais limitações para o tratamento destas infecções. Desta forma torna-se necessário o desenvolvimento de novos antifúngicos para combater infecções persistentes. Nesse contexto, derivados de *N*-acetilglicosamina substituídos em diferentes posições e de sulfonamidas de *N*-acetilglicosamina e de glicose podem vir a ter um importante papel na terapia antifúngica, visto que já há diversos estudos relatando atividades biológicas de derivados de carboidratos e entre elas a atividade antifúngica. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade de isolados de *Candida* spp. frente à uma série inédita de 10 derivados de carboidratos. Para isso, realizou-se um *screening* antifúngico contra as cinco espécies de *Candida* mais prevalentes em infecções: *C. albicans* (CA), *C. glabrata* (CG), *C. krusei* (CK), *C. parapsilosis* (CP) e *C. tropicalis* (CT). Para os derivados ativos, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI 2008). Os derivados **1** e **7** foram os únicos que apresentaram atividade, frente a alguns dos isolados testados (CG RL12m para o primeiro e CP RL33 para ambos), com CIMs respectivas de 128 µg/mL e 256 µg/mL (substância **1**) e 32 µg/mL (substância **7**). Enfim, dois dos derivados apresentaram resultados satisfatórios nos testes de suscetibilidade *in vitro*, confirmando o potencial como promissores compostos antifúngicos. Entretanto, ainda são necessários mais estudos com enfoque no mecanismo de ação e, principalmente, análise da toxicidade. Ainda é necessária uma análise da relação estrutura-atividade para otimização das substâncias e por conseguinte torná-las mais potentes, bem como simplificar seus processos de síntese.

Palavras-chave: *Candida*, resistência, derivados de carboidratos, triagem, CIM.

Abstract

Since the late 60s, when antibacterial therapies were developed, there was a drastic increase in fungal infections. Today, the resistance to antifungal agents is a major limitation for the treatment of these infections. Thus, it is necessary to develop new antifungals to combat persistent infections. In this context, *N*-acetylglucosamine derivatives bearing substituents at different positions and *N*-acetylglucosamine and glucose sulfonamides could have an important role in antifungal therapy, since there are already many studies that relate the biological activity of carbohydrate including the antifungal activity. Thus, the objective of this study was to evaluate a novel series of 10 carbohydrate derivatives against isolates of *Candida* spp. Antifungal screening was carried out against the five most prevalent species of *Candida* infections: *C. albicans* (CA), *C. glabrata* (CG), *C. krusei* (CK), *C. parapsilosis* (CP) and *C. tropicalis* (CT). For derivative assets, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution broth method (CLSI 2008) for sensitive isolates. Derivatives **1** and **7** exhibited activity against some of the isolates tested (CG RL12m for the first and CP RL33 for both), with MICs respective 128 ug / ml and 256 ug / mL (substance **1**) and 32 ug / ml (substance **7**). Finally, two compounds showed relevant activity, confirming their potential as promising antifungal compounds. However, it is necessary more studies focusing on the mechanism of action and, especially, analysis of toxicity. Furthermore, it is necessary to perform a study of structure-activity relationships in order to optimize the compounds and simplify the synthesis.

Keywords: *Candida*, resistance, carbohydrate derivatives, screening, MIC.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

5-FUTP: trifosfato de 5-fluorouridina

A: ativa

Ac: acetil

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AZT: zidovudina

Céls: células

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

DMSO: dimetilsulfóxido

EUA: Estados Unidos da América

EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

Ex.: exemplo

GI₅₀: inibição 50% do crescimento celular

HIV-1: Vírus da Imunodeficiência Humana-1

ICS: infecção da corrente sanguínea

K_i: constante de inibição

MOPS: ácido morfolinopropano sulfônico

Ms: mesilato

NA: não ativa

Ph-CH: benzilideno

R: resistente

RNA: ácido ribonucleico

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S: sensível

SDA: ágar sabouraud dextrose

SDD: sensível dose dependente

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lista de Figuras

FIGURA 1. ESTRUTURAS DOS ÉSTERES GRAXOS DE SACAROSE, DE MALTOSE E DE MALTOTRIOSE.	14
FIGURA 2. ESTRUTURAS DAS MOLÉCULAS 1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZÓIS LIGADAS A DIFERENTES CARBOIDRATOS.	15
FIGURA 3. ARABINOFURANOSILCITOSINA E SEUS DERIVADOS DE ÁCIDOS GRAXOS.	16
FIGURA 4. ESTRUTURAS DA QUIMIOTECA DE 1-(1',2,3,3',4,4',6-HEPTA-O-ACETIL-6'-DESOXI- SUCROS-6'-IL)-1,2,3-TRIAZÓIS.....	17
FIGURA 5. ESTRUTURA 4,5-DI-HIDROXIMETIL-1-(METIL-4,6-DIDESOXI-A-D-GLICOPIRANOSID- 4-IL)-1H-1,2,3-TRIAZOL, ATIVA PARA A-GLICOSIDASE E ISOMALTASE DE LEVEDURA. ...	18
FIGURA 6. DERIVADOS N- E S-B-D-GLICOSÍDICOS CONJUGADOS COM 1,2,4-TRIAZÓIS DE 1 À 10.....	19
FIGURA 7. DERIVADOS N- E S-B-D-GLICOSÍDICOS CONJUGADOS COM 1,2,4-TRIAZÓIS DE 11 À 14.....	20
FIGURA 8. ESTRUTURA 4-ALIL-2-METOXIFENIL-(4',6'-O-BENZIL-B-D-GLICOPIRANOSÍDEO).	21
FIGURA 9. ESTRUTURA BASE N-ALQUIL-B-D-GLICOSILAMINA COM SEUS SUBSTITUINTES. ...	22
FIGURA 10. ESTRUTURA 2-ACETIL-D-ERITRO-HEX-2-ENOPIRANOSIL SULFONAMIDA.	23

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Breve Histórico.....	3
2.2. Infecções Fúngicas	4
2.2.1. Infecções Causadas pelo Gênero <i>Cândida</i> e Edipemiologia das Espécies.....	5
2.3. Terapia antifúngica.....	7
2.4. Resistência aos Antifúngicos	9
2.5. Carboidratos.....	12
3. Objetivo Geral	24
3.1. Objetivos Específicos	24
4. Materiais e métodos	25
4.1. Obtenção dos Carboidratos	25
4.2. Seleção dos Micro-Organismos.....	25
4.3. Preparo das Soluções Teste Contendo os Derivados de Carboidratos	25
4.4. Teste de Suscetibilidade.....	27
4.4.1. Preparo do Inóculo.....	28
4.4.2. Microdiluição em Caldo.....	28
4.4.3. Leitura e Interpretação dos Resultados	29
5. Resultados e Discussão.....	30
6. Conclusão	34
7. Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

A Idade de Ouro da Microbiologia durou cerca de 60 anos, iniciando em 1857 com Louis Pasteur. Foi um período muito produtivo, com grandes descobertas, onde se formaram as bases para a microbiologia do século XX (Tortora, 2012). Hoje possuímos muitos avanços na área da microbiologia, entretanto, ainda são encontrados muitos desafios. A alta taxa de resistência aos antimicrobianos utilizados atualmente, juntamente com a emergência de micro-organismos oportunistas tem trazido sérias preocupações para a saúde pública mundial.

Nos últimos anos, a incidência e gravidade de doenças fúngicas têm crescido de forma considerável, principalmente devido ao aumento da sobrevivência de pacientes críticos, os quais apresentam o sistema imunológico debilitado (Vandeputte *et al.*, 2012; Morace *et al.*, 2014). *Candida* spp. é um dos micro-organismos oportunistas mais importantes e tem relevantes implicações em infecções nosocomiais da corrente sanguínea, com alto grau de severidade (Doi *et al.*, 2016). As infecções por esse micro-organismo podem levar a um tempo prolongado de hospitalização e gerar um alto custo ao sistema de saúde. *Candida albicans* é considerada a espécie mais frequentemente associada à candidemia, entretanto, espécies não-*albicans* estão emergindo, destacando-se *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (Lortholary *et al.*, 2014).

Apesar das opções de tratamento disponíveis, tais micoses estão associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade (Ahmed *et al.*, 2014). Isso ocorre, principalmente, devido à crescente resistência aos agentes antifúngicos, apresentada por *Candida* spp. Os tratamentos indiscriminadamente utilizados na profilaxia podem levar ao desenvolvimento de resistência e o uso inadequado de um agente antifúngico pode, por pressão seletiva, favorecer a multiplicação de cepas resistentes, tornando algumas terapias ineficazes (Ahmed *et al.*, 2014; Izquierdo *et al.*, 2015).

Diante do aumento das infecções fúngicas associado à crescente resistência desses micro-organismos às terapias usadas, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (Kauffman, 2006). Além da eficácia contra as espécies de fungos, é importante que o agente antifúngico apresente um bom perfil de segurança.

De grande importância como substâncias bioativas, os carboidratos estão entre os compostos mais abundantes provenientes de fontes naturais, presentes em plantas e animais

e participam de um grande número de ciclos bioquímicos. Há um crescimento surpreendente de seu estudo nos últimos anos, principalmente com relação à diversidade de aplicações biológicas, podendo-se destacar atividades antibacterianas, antivirais, antineoplásicas, antifúngicas, entre outras (Nogueira *et al.*, 2009).

Apoiado no conhecimento sobre sua participação em diversos processos bioquímicos nos organismos vivos, na sua grande abundância, nos diversos estudos sobre sua atividade contra fungos, os carboidratos, que possuem grupos hidroxilas podendo ser quimicamente modificados, têm sido muito utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos (Nogueira *et al.*, 2009; Leoneti *et al.*, 2010; Crucho *et al.*, 2015). Contudo, poucos trabalhos relatando a atividade antifúngica de derivados de carboidratos estão publicados, sendo este um excelente campo para investigação.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Breve Histórico

Em 1674, o biólogo holandês, Anton van Leewenhoek, descobriu em uma gota d'água milhões de pequenos “animalículos” ao analisá-la em seu microscópio. Foi em 1840, portanto, 166 anos depois, que o patologista alemão, Friedrich Henle, veio a propor critérios para provar que os micro-organismos causavam doenças nos seres humanos. Entretanto, esta teoria só foi confirmada nas décadas de 70 e 80 deste século, por Robert Koch e Louis Pasteur (Murray, 2010).

O mundo onde vivemos é repleto de uma infinidade de micro-organismos, os quais se encontram no ambiente, sendo a grande maioria benéfica. Há uma minoria que é patogênica e que ao entrar em contato com o indivíduo irá causar algum tipo de doença. Outros, entretanto, só estabelecerão doença em circunstâncias bem definidas. Muitos vivem sobre e dentro do nosso corpo (microbiota normal) e não nos trazem malefícios em situações normais, sendo benéficos muitas vezes. O equilíbrio entre as defesas naturais do corpo e as propriedades do micro-organismo de desenvolver patologias é que vão definir uma relação simbiótica ou um processo patológico. Nosso corpo possui mecanismos de resistência naturais, como a barreira da pele, ácido estomacal, sistema imune, entre outros. Quando essas defesas não são suficientes para combater e eliminar os micro-organismos causadores da patologia, então, se usa os antimicrobianos para ajudar a controlar a infecção e eliminar o agente etiológico (Tortora, 2012; Murray, 2010).

O primeiro agente antibacteriano foi descoberto em 1910, pelo médico alemão Paul Ehrlich. Era um composto derivado do arsênico, efetivo contra a espiroqueta causadora da sífilis (Tortora, 2012; Murray, 2010). Assim deu-se o início à era da quimioterapia, seguindo-se com Alexander Fleming em 1928 no St. Mary's Hospital de Londres, com a descoberta da penicilina; Gerard Domagk com a sulfanilamida em 1935; e Selman Waksman, em 1943, descobriu a estreptomicina. Porém o uso da penicilina na terapêutica só foi realidade a partir de 1943 (Martins *et al.*, 2006; Murray, 2010).

Por aproximadamente quatro décadas, entre 1940 e final da década de 1970, a indústria farmacêutica teve um fluxo constante de lançamento de novos antimicrobianos,

muitos com novos mecanismos de ação para tentar resolver o problema da resistência aos anteriores (ECDC/EMEA JOINT TECHNICAL REPORT, 2016).

Até o início do século 20, as epidemias bacterianas eram globalmente uma importante causa de morte enquanto que as infecções fúngicas não eram consideradas relevantes. Porém, até o final de 1960 muitas terapias antibióticas haviam sido desenvolvidas e, deste modo, observou-se um drástico aumento das infecções fúngicas (Enoch *et al.*, 2006; Vandeputte *et al.*, 2011).

2.2. Infecções Fúngicas

Nos dias atuais, as infecções fúngicas representam um problema de saúde pública e são influenciadas pelo crescimento dos casos relacionados à imunodeficiência, tais como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), envelhecimento, transplantes, procedimentos cirúrgicos, pacientes em uso de cateter venoso central, entre outros (Enoch *et al.*, 2006; Vandeputte *et al.*, 2011).

Assim como já mencionado acima, as infecções são provocadas por patógenos primários ou por micro-organismos oportunistas. Os primeiros são naturalmente capazes de estabelecer uma infecção, mesmo em indivíduos saudáveis; já os segundos, são capazes de desenvolver a infecção quando critérios específicos são atendidos, como nos casos de imunocomprometimento (Vandeputte *et al.*, 2011).

Os fungos podem ser encontrados como parasitas de plantas e animais, causando grandes perdas em plantações e graves problemas veterinários. Nos seres humanos podem causar alergias, doenças leves e até mesmo doenças mais severas que podem levar a morte se não forem tratadas adequadamente (Vandeputte *et al.*, 2011).

As infecções podem ser classificadas conforme o tecido infectado em:

- Micoses superficiais: os fungos se instalam em regiões mais externas da pele e cabelo. Entre as espécies mais comuns estão a *Malassezia globosa* e *M. furfur*;
- Micoses cutâneas: atingem estruturas do corpo que são queratinizadas. São causadas por fungos conhecidos como dermatófitos e os gêneros mais comumente envolvidos são *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*;
- Micoses subcutâneas: podem ser causadas por fungos como *Sporothrix schenckii* e a lesão dá-se a partir do ponto de inoculação do fungo;

- Infecções nas mucosas: em geral causadas por leveduras oportunistas, em sua maioria pelo gênero *Candida*, embora em menor proporção possam ser causadas por fungos filamentosos;
- Micoses sistêmicas: podem ser extremamente graves. São muito comuns em pacientes imunodeprimidos, apresentam taxa de mortalidade elevada e os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos são *Candida*, *Pneumocystis*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus*, e *Coccidioidomyces* (Vandeputte *et al.*, 2011).

O desenvolvimento na pesquisa médica permitiu um melhor controle das doenças neoplásicas e aumento da sobrevivência de pacientes críticos ou aqueles com insuficiência do sistema imunológico, porém, este progresso acarretou em um aumento na ocorrência de fatores de risco para infecções fúngicas sistêmicas (Morace *et al.*, 2014). *Candida* spp. é a mais importante causa de micoses oportunistas em todo o mundo e uma das principais causas de infecção nosocomial, na corrente sanguínea (Pfaller *et al.*, 2007).

2.2.1. Infecções Causadas pelo Gênero *Candida* e Epidemiologia das Espécies

Leveduras do gênero *Candida* spp. residem como micro-organismos comensais na pele e membranas mucosas (como nos tratos gastrointestinal e genito-urinário) sem causar danos. Porém, quando seu crescimento é excessivo ou os mecanismos de defesa do hospedeiro encontram-se comprometidos, podem se tornar patógenos oportunistas e desenvolver uma infecção (candidíase). Mais de 20 espécies deste gênero estão associadas à candidíase, sendo *C. albicans* a mais comum (Denning, 2003; CDC, 2013).

As infecções causadas por *Candida* spp. podem se manifestar de duas maneiras: infecção superficial, como acontece com as infecções cutâneas ou da mucosa; e também infecção invasiva (ou sistêmica), onde há invasão da *Candida* sp. em um ou mais órgãos humanos. Quando essa ocorre através da corrente sanguínea é chamada de candidemia e se vários órgãos são afetados, a condição recebe o nome de candidíase disseminada, a qual tem alto grau e severidade (Flevari *et al.*, 2013).

A candidíase invasiva é uma doença que está relacionada à alta morbidade e mortalidade (Pappas *et al.* 2003; Morgan *et al.* 2005). Além disso, estas infecções estão associadas a custos elevados e ao aumento do tempo de permanência do paciente no hospital (Lockhart *et al.*, 2014). Os indivíduos com maior risco de candidíase invasiva incluem

pacientes gravemente doentes, pessoas em tratamentos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), neutropênicos com câncer, aqueles submetidos a procedimentos cirúrgicos e recém-nascidos prematuros (Pfaller *et al.*, 2007).

Infecções por *Cândida* spp. mostram padrões de incidência distintos em todo o mundo e podem apresentar diferentes características epidemiológicas, variando entre as regiões. Essa distribuição está associada às condições e características referentes às morbidades do paciente (Nucci *et al.*, 2010).

Espécies de *Candida* são a quarta principal causa de infecção da corrente sanguínea (ICS) nosocomial nos Estados Unidos, responsável por 8% a 10% de todas as ICSs adquiridas no hospital (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Neste país, 92 a 95% dos casos de candidíase invasiva são causadas por cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Isso tem permanecido constante ao longo das últimas décadas, mudando apenas a proporção entre elas (Lyon *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2010; Lockhart *et al.*, 2012).

Na década de 80, *C. albicans* foi o patógeno fúngico mais isolado (59,7%); outras espécies de *Candida* representavam 18,6% dos isolados nos hospitais dos EUA (Sagué e Jarvis, 1993). Entretanto, a distribuição das espécies começou a mudar na década de 90, na qual espécies de *Candida* não-*albicans*, especialmente *C. glabrata*, aumentaram a incidência (Pfaller *et al.*, 1998). Em um estudo epidemiológico realizado entre 2004 e 2007, com 41 hospitais dos EUA, foi relatado 5900 casos de candidíase invasiva. Entre os casos, 44% foram ocasionados por *C. albicans*, 25% por *C. glabrata*, 18% por *C. parapsilosis* e 9% por *C. tropicalis* (Lyon *et al.*, 2010).

Em uma comparação longitudinal da vigilância em Atlanta, observou-se que a proporção de infecções por *C. albicans* caiu de 52% (1992) para 41% (2011). No mesmo período, infecções por *C. glabrata* aumentaram de 12% para 27%. Em Baltimore, entre 2000 e 2011, infecções por *C. albicans* diminuíram de 43% para 34%, infecções por *C. parapsilosis* aumentaram de 11% para 16% e por *C. glabrata* subiram de 28% para 31% (Lockhart, 2014).

Em nosso país, a Rede Brasileira de Estudos de Candidemia constatou que infecções por *C. albicans* representam 40,9% dos casos, seguido de *C. tropicalis* com 20,9%, *C. parapsilosis* com 20,5% e *C. glabrata* com 4,9% do casos (Colombo *et al.*, 2006). Esta distribuição de espécies foi consistente em diferentes estudos no Brasil (Costa *et al.*, 2000;

Antunes *et al.*, 2004; Aquino *et al.*, 2005), Argentina (Rodero *et al.*, 1999; Estrella *et al.*, 2002; Rodero *et al.*, 2005) e Chile (Silva *et al.*, 2004). Porém, estudos mais recentes têm demonstrado que *C. parapsilosis* é a *Candida* não-*albicans* mais prevalente no Brasil. (Lortholary *et al.*, 2014).

Em um estudo observacional prospectivo, de 2002 a 2003, em quatro centros terciários no Brasil, concluiu-se que *C. parapsilosis* foi responsável por 23% dos casos. Os indivíduos mais propensos a candidemia por essa espécie foram os pacientes com cateter venoso central, dando suporte à teoria de que uma fonte de ligação com o meio externo é o principal modo de infecção (Brito *et al.*, 2006). Além disso, as mãos dos profissionais de saúde são importantes vetores na aquisição exógena de *C. parapsilosis*, comensalmente encontrada na pele humana. Isso representa uma grande ameaça para pacientes internados, principalmente nos casos em que os protocolos de lavagem das mãos são infringidos (Trofa *et al.*, 2008).

Ainda, cabe ressaltar que a taxa de mortalidade difere conforme a espécie que ocasiona a infecção. A menor mortalidade está associada a *C. parapsilosis* (10 a 15%) e a mais alta está associada a *C. tropicalis* e *C. glabrata* (40 a 70%). As outras espécies, incluindo *C. krusei*, têm mortalidade semelhante a *C. albicans* (20 a 40%) (Krcmery *et al.*, 2002).

2.3. Terapia antifúngica

Mesmo com uma extensa pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, os medicamentos disponíveis para tratar infecções fúngicas sistêmicas são limitados. Quatro classes moleculares são as mais utilizadas: análogos de fluoropirimidina (ex. flucitosina), polienos (ex. anfotericina B), azóis (ex. fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) e equinocandinas (ex. micafungina, anidulafungina). Existem outras classes que são usadas apenas como agentes tópicos, devido aos efeitos adversos quando administrados sistemicamente e também devido à baixa eficácia (Vandeputte *et al.*, 2011; Izquierdo *et al.*, 2015).

A flucitosina (ou 5-fluorocitosina) é captada na célula fúngica pela citosina permease, onde é desaminada a 5-fluorouracil. Segue numa rota até a formação de 5-fluorouridina, que é incorporado ao RNA, o que interfere na síntese de proteínas no interior da célula fúngica.

Além disso, a trifosfato de 5-fluorouridina (5-FUTP) também pode ser convertida a 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato, que é potente inibidor da timidilato sintetase, resultando no comprometimento do DNA (Silva *et al.*, 2012; Brunton, 2012). A flucitosina é utilizada principalmente para infecções ocasionadas por leveduras e costuma ser usada em combinação com outros antifúngicos, devido ao rápido desenvolvimento da resistência (Silva *et al.*, 2012.)

Os azóis ligam e inibem a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, a qual é envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol (componente essencial da membrana fúngica). Por esse motivo, a síntese do ergosterol é interrompida, o que altera a estrutura da membrana e suas funções e assim, conseqüentemente, o crescimento fúngico é inibido (Kanafani e Perfect, 2008; Pfaller, 2012). Fluconazol é o fármaco desta classe mais amplamente utilizado para infecções sistêmicas por *Cândida* spp., principalmente em países subdesenvolvidos, entretanto, problemas relacionados à resistência intrínseca de *C. glabrata* e *C. krusei* são altamente preocupantes. *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* geralmente são suscetíveis a esta classe. Os novos derivados azólicos, como voriconazol, são bastante eficazes, mas apresentam alto custo (Denning e Hope, 2010).

As equinocandinas inibem a enzima β -1,3-D-glucana sintase, desta maneira perturba a biossíntese de β -1,3-D-glucana, um componente chave da parede celular fúngica. Assim, há formação de um defeito na parede celular associado à instabilidade osmótica e lise celular (Perlin, 2007; Pfaller, 2012). São antifúngicos bastante utilizados para candidíases invasivas e são usados com segurança em pacientes com insuficiência renal e hepática, mas com o tempo também pode ocorrer resistência fúngica (Lockhart *et al.*, 2014).

A anfotericina B interage com o ergosterol da membrana fúngica, levando à formação de poros transmembranares. Estes poros alteram a permeabilidade celular, permitindo, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos (principalmente íons potássio), resultando em morte celular (Bolard *et al.*, 1993). Anfotericina B é o tratamento de escolha para diversas doenças invasivas fúngicas, incluindo infecções por *C. glabrata* e *C. krusei*, porém apresenta sérios problemas de toxicidade, devido à semelhança entre o ergosterol da célula fúngica e o colesterol das células de mamíferos (Denning e Hope, 2010; Flevari *et al.*, 2013).

Os micro-organismos desenvolvem mecanismos para combater o efeitos fungicidas e/ou fungistáticos de todas as classes de antifúngicos e esses baseiam-se em: reduzir a

acumulação do fármaco no interior da célula fúngica, diminuir a afinidade da substância pelo seu alvo e alterações do metabolismo para contrabalançar o efeito da substância sobre a célula (Vandeputte *et al.*, 2011).

2.4. Resistência aos Antifúngicos

Os tratamentos antifúngicos são usados em infecções já instaladas, mas, em muitos casos, também são usados na profilaxia. No tratamento profilático as doses medicamentosas são menores e a exposição frequente a concentrações subinibitórias dos fármacos pode desencadear resistência a algumas terapias, visto que os micro-organismos podem desenvolver estratégias de adaptação. Além disso, o uso indiscriminado de antifúngicos e um tratamento inadequado podem selecionar cepas resistentes através de pressão seletiva, contribuindo assim para a emergência de micro-organismos com menor suscetibilidade (Izquierdo *et al.*, 2015). Portanto, a resistência emergiu de duas maneiras principais: a seleção de micro-organismos intrinsecamente resistentes (resistência primária ou intrínseca), ou seja, sem contato prévio com a substância, e o desenvolvimento da resistência em resposta à exposição a um agente antimicrobiano (resistência secundária, adquirida ou extrínseca) (Izquierdo *et al.*, 2015; Kanafani e Perfect, 2008). Cabe destacar aqui, que se compararmos com a resistência em bactérias, a resistência adquirida em *Candida* é um evento diferente, pois os mecanismos de resistência não são transferidos através de plasmídeos entre as células de leveduras. Dessa maneira, a resistência adquirida se desenvolve em cada isolado durante a exposição ao antifúngico (Arendrup, 2013).

Além disso, dois conceitos específicos são extremamente importantes quando se estuda resistência: resistência clínica e resistência microbiológica.

Define-se como resistência clínica a incapacidade do agente antifúngico em erradicar uma infecção fúngica, mesmo que este tenha atividade *in vitro* contra o organismo. Ou seja, é quando um agente antimicrobiano está associado a uma alta probabilidade de falha, pois o agente patogênico é inibido por uma concentração antimicrobiana que é maior do que poderia ser conseguida com esquemas de dosagem de segurança (Kanafani e Perfect, 2008; Pfaller, 2012). Estas falhas podem ser atribuídas a uma combinação de fatores relacionadas com o hospedeiro e com o agente antifúngico, como também podem estar relacionadas ao agente patogênico. Nem sempre poderão ser previstas e, por isso, a individualização de

estratégias de tratamento é importante, com a realização de uma avaliação da situação clínica do paciente (Kanafani e Perfect, 2008).

A resistência microbiológica define-se nos casos em que não há suscetibilidade de um fungo a um agente antifúngico por testes de suscetibilidade *in vitro*, nos quais a concentração inibitória mínima (CIM) da substância testada ultrapassa o ponto crítico de suscetibilidade definido para aquele micro-organismo (Kanafani e Perfect, 2008).

A falha do tratamento e o desenvolvimento da resistência têm causas multifatoriais, que podem estar relacionadas ao hospedeiro, ao fármaco e ao fungo. Quando relacionada ao hospedeiro são importantes: o estado imunológico, o local e a gravidade da infecção, se há a presença de corpos estranhos ou dispositivos invasivos (como por exemplo, cateteres), a formação de abscessos, a adesão ao tratamento e o correto uso do medicamento. Quando relacionado ao fármaco considera-se: a atividade fungistática ou fungicida, a dosagem, a farmacocinética e as interações medicamentosas. No que se refere ao fungo destaca-se: organização celular (leveduras ou hifas), o fenótipo, o genótipo, a estabilidade genômica, a carga microbiana e a formação de biofilme (Murray *et al.*, 2008).

Como exemplo de resistência podemos citar a espécie *C. krusei*, a qual é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol. A resistência extrínseca geralmente é dependente da expressão de gene alterado e, neste grupo, encontra-se o desenvolvimento de resistência ao fluconazol por *C. albicans* (Marichal *et al.*, 1999; Kanafani e Perfect, 2008). Alguns isolados de *C. glabrata* podem ser intermediariamente resistentes a todos os azóis e cerca de 20% dos isolados desenvolvem resistência durante a terapia ou profilaxia com fluconazol (Rex *et al.*, 1995). Além disso, relatórios adicionais de centros médicos nos EUA e na Dinamarca documentaram a presença de cepas de *C. glabrata* multirresistentes, ou seja, com resistência a duas ou mais classes de agentes antifúngicos. Indica-se, com isso, um sinal de alerta quanto a real eficácia dos agentes antifúngicos disponíveis (Dodgson *et al.*, 2005; Madsen *et al.*, 2006; Kofteridis *et al.*, 2010).

A caspofungina tem uma ação antifúngica potente e tem mostrado ser tão eficaz e menos tóxica que a anfotericina B no tratamento de candidíase invasiva (Duarte *et al.*, 2002). Porém, existem estudos mostrando que há isolados com resistência às equinocandinas. A resistência a esta classe é mais frequentemente encontrada em *C. glabrata*, mesmo esta espécie sendo menos frequente que *C. albicans* (Dannaoui *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2014). O porquê deste fato ainda não foi totalmente compreendido,

entretanto, pode ser devido a um maior potencial de *C. glabrata* desenvolver mutações que geram resistência; ou devido aos pacientes com infecções por esse micro-organismo receberem frequentemente terapia prolongada de equinocandinas (em função da baixa suscetibilidade ao fluconazol) (Arendrup e Perlin, 2014). A resistência em *C. glabrata* está aumentando e isto foi recentemente documentado em uma pesquisa, no Hospital da Universidade de Duke, onde a taxa de resistência às equinocandinas aumentou de 4,9% para 12,3% entre 2001 e 2010 (Alexander *et al.*, 2013). Uma tendência semelhante foi observada em uma pesquisa de fungemia a nível nacional na Dinamarca. Nesse país, entre 2008 e 2009, 0,9% dos isolados de *C. glabrata* proveniente de infecções na corrente sanguínea eram resistentes às equinocandinas, já entre 2010 e 2011 subiu para 1,2%, e entre 2012 e 2013, 3,1% foram resistentes (Arendrup, observações não publicadas, 2014).

Há também relatos de infecções com *C. parapsilosis* em que o paciente apresentou resistência ao tratamento com anfotericina B (Tunkel *et al.*, 1993; Yalaz *et al.*, 2006). Também há estudos relatando a resistência *in vitro* de *C. parapsilosis* a esse antifúngico, a uma taxa de 2 a 3% (Zeichner *et al.*, 2003). Além disso, *C. parapsilosis* demonstrou resistência ao voriconazol, onde observou-se 1,9% de isolados resistentes em 9.371 que foram analisados (Pfaller *et al.*, 2010). Apesar das taxas de resistência apresentadas não serem valores tão expressivos, indica-se um sinal de alerta.

Embora hoje em dia menos frequentemente utilizada, a flucitosina pode ser administrada em combinação com anfotericina B ou azóis, especialmente referente à meningite por *Cândida* sp. (Smego *et al.*, 1984). A monoterapia é contraindicada, devido ao alto risco de desenvolvimento de resistência, principalmente em administração prolongada, como na endocardite (Hoeprich *et al.*, 1974).

O diagnóstico precoce e correto das infecções fúngicas é de fundamental importância, além de ter um controle apropriado da fonte infecciosa e também o tratamento antifúngico adequado (Dóí *et al.*, 2016).

Atualmente, existem dois métodos de referência para testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* para *Candida* spp. Os métodos foram desenvolvidos por duas instituições: Clínical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e a AFST Subcommittee of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), sendo continuamente atualizados (Morace *et al.*, 2014; CLSI, 2008; EUCAST, 2008). Melhorias na capacidade dos métodos de ensaio para detectar a suscetibilidade antifúngica e padrões de

resistência, juntamente com caracterização molecular de mecanismos de resistência, são úteis para otimizar a eficácia da terapia antifúngica. Pesquisas e dados epidemiológicos locais e regionais podem ser utilizados para desenvolver estratégias de tratamento empírico e são essenciais para acompanhar as tendências de resistência (Pfaller, 2012).

Mesmo com as opções atuais de tratamento, as taxas de mortalidade devido a infecções fúngicas invasivas podem chegar a 50-90%, dependendo do patógeno e da população de pacientes (Pfaller e Diekema, 2007; Finkel e Mitchell, 2011). Isso nos mostra a necessidade de novas estratégias de tratamento e desenvolvimento de novos fármacos. Novas classes de antimicrobianos com diferentes estruturas químicas, com novos mecanismos de ação e que apresentem boa biodisponibilidade e bom perfil de segurança são focos importantes de pesquisas.

A natureza eucariótica comum de células fúngicas e células humanas torna difícil identificar uma rota metabólica específica ou alvos fúngicos apropriados para antimicrobianos e, concomitante a isso, conseguir controlar a toxicidade para o hospedeiro. Isso acaba restringindo o número de agentes antifúngicos que sejam seguros e eficazes. O papel fisiológico fundamental e a diferente composição de esteróis (colesterol: seres humanos; ergosterol: fungos) presentes na membrana celular, faz com que a membrana citoplasmática dos fungos se torne um alvo adequado para a ação desses agentes, com um índice terapêutico bom. Além disso, a parede celular também representa um alvo muito interessante, uma vez que células humanas não apresentam essa estrutura. Equinocandinas são exemplos de antifúngicos que agem na parede celular em nível metabólico (Morace *et al.*, 2014). Novos antimicrobianos devem ser desenvolvidos seguindo este raciocínio.

2.5. Carboidratos

Os carboidratos são substâncias naturais que representam uma fonte incalculável de novos compostos bioativos, que podem ser usados da forma que são encontrados na natureza ou podem ser modificados quimicamente, com o objetivo de melhorar suas características, tais como potência, propriedades físico-químicas e toxicidade (De Souza *et al.*, 2016).

Encontrados naturalmente em diversos processos biológicos, os glicosídeos são biologicamente muito importantes. Eles são constituídos primordialmente de carboidratos de tamanho e complexidade variada, podendo conter uma porção não carboidrato, entretanto, é

a porção carboidrato que tem, geralmente, papel principal nos fenômenos biológicos. Dessa forma, os carboidratos, contendo grupos hidroxilas, têm sido largamente utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos com a finalidade de melhorar a solubilidade em água e aumentar a interação destes com os receptores alvos, numa tentativa de mimetizar e/ou aumentar a eficiência da ligação natural do carboidrato com o alvo biológico (Leoneti *et al.*, 2010, Crucho *et al.*, 2015, Petrova *et al.*, 2015).

Há mais de 100 anos os carboidratos têm sido importantes e o estudo sobre suas atividades biológicas tem crescido de forma surpreendente, principalmente ao que se refere à suas aplicações a nível biológico (Nogueira *et al.*, 2009). As respostas biológicas por carboidratos tiveram um de seus trabalhos pioneiros publicados em 1958, onde foi demonstrada uma atividade antitumoral promovida por polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Bradner *et al.*, 1958). Desde então inúmeros trabalhos envolvendo suas atividades biológicas já foram realizados (Mellinger, 2006).

Alguns ésteres graxos de sacarose, de maltose e de maltotriose (Figura 1) foram preparados e testados como inibidores de glicosiltransferases de *Streptococcus sobrinus*. As glicosiltransferases sintetizam polissacarídeos a partir da sacarose, o que permite a colonização na superfície dos dentes. Estes compostos apresentaram grande capacidade de inibir o crescimento de *Streptococcus sobrinus*, com grande potencial de inclusão em produtos de higiene oral para o combate da placa bacteriana e prevenção de cáries (Devulapalle *et al.*, 2004).

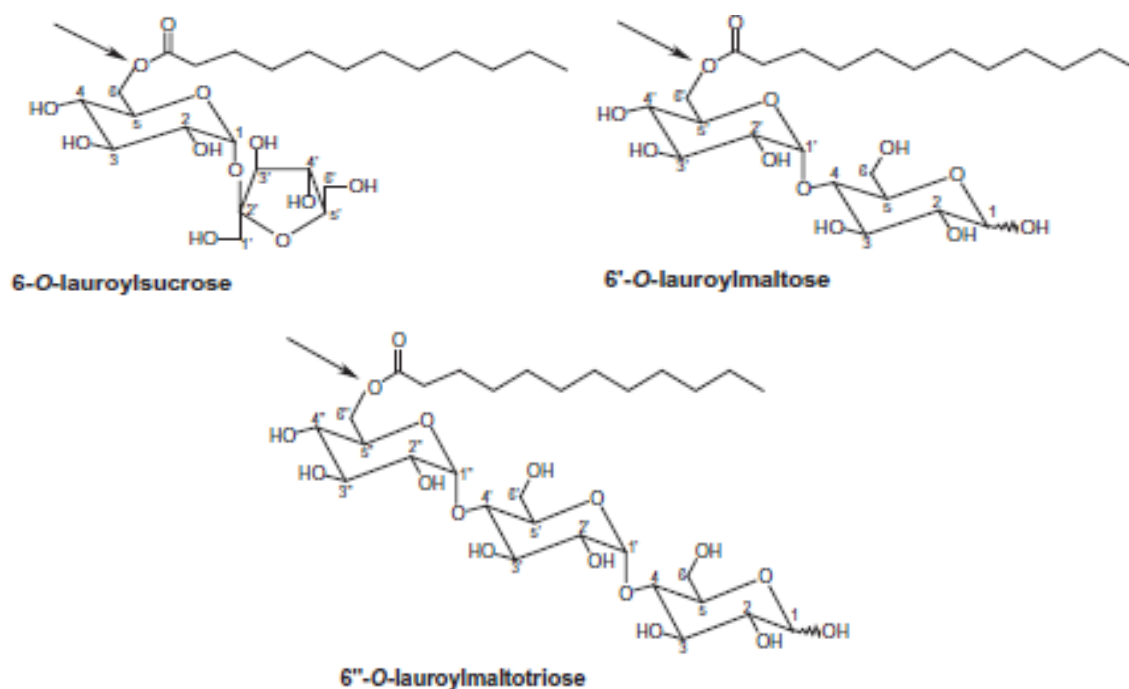


Figura 1. Estruturas dos ésteres graxos de sacarose, de maltose e de maltotriose.

Fonte: (Devulapalle *et al.*, 2004)

Em relação ao uso em infecções virais, foi relatada a síntese de vários 1-benzil-1H-1,2,3-triazóis ligados a diferentes carboidratos (conforme Figura 2). Foi realizada a análise *in vitro* de seus perfis como inibidores da transcriptase reversa do HIV-1, e estes foram comparados a compostos antivirais clássicos. Os resultados mostraram que algumas das substâncias testadas foram consideravelmente ativas, inibindo a enzima transcriptase reversa do HIV-1, com menor citotoxicidade do que a zidovudina (AZT). Estes foram, então, apontados como compostos importantes para a geração de novos antirretrovirais (Da Silva *et al.*, 2009).

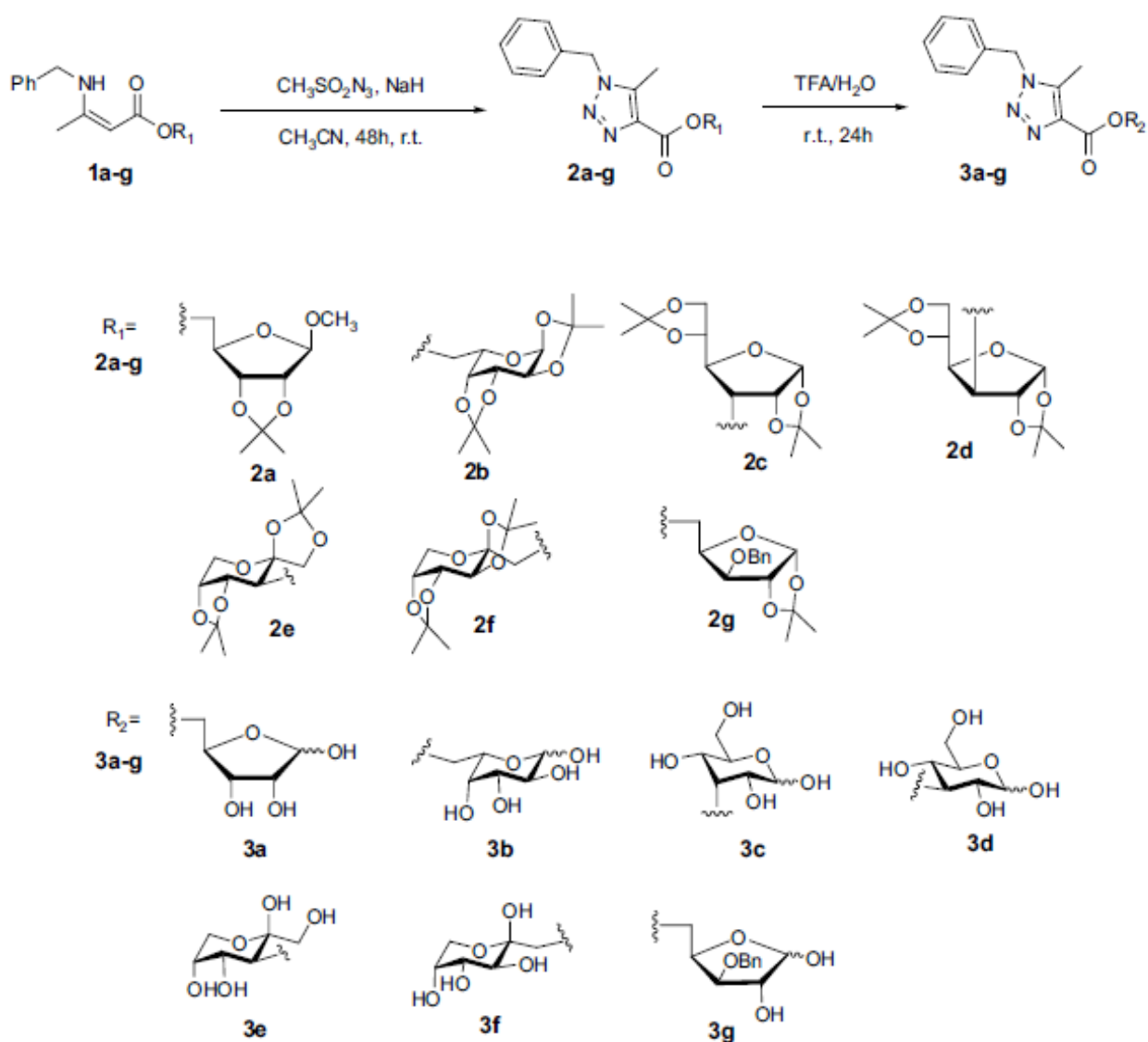


Figura 2. Estruturas das moléculas 1-benzil-1H-1,2,3-triazóis ligadas a diferentes carboidratos.

Fonte: (Da Silva *et al.*, 2009)

Também já foi verificado a atividade antiproliferativa e mecanismo de ação de derivados de ácidos graxos da arabinofuranosilcitosina (Figura 3) frente à leucemia e células tumorais sólidas. O derivado arabinofuranosilcitosina com um ácido graxo com uma cadeia de 18 carbonos e apenas uma ligação dupla, denominado CP-4055, mostrou-se bastante ativo (Bergman *et al.*, 2004).

Compound	double bonds	chain length	Structure R
CP-4055	1	18	
CP-4056	0	18	
CP-4057	1	20	
CP-4091	1	20	
CP-4092	2	18	
CP-4093	0	16	
CP-4094	1	16	
CP-4095	3	18	
CP-4096	0	20	
CP-4097	1	22	
CP-4098	3	18	
Ara-C	0	0	

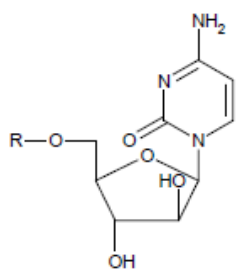


Figura 3. Arabinofuranosilcitosina e seus derivados de ácidos graxos.

Fonte: (Bergman et al., 2004)

Poucos estudos com derivados de carboidratos visando à atividade antifúngica foram realizados até o presente momento. Alguns casos relevantes foram relatados a seguir.

Em um estudo de Petrova e colaboradores, foi avaliada uma quimioteca de 1-(1',2,3,3',4,4',6-hepta-*O*-acetil-6'-desoxi-sucros-6'-il)-1,2,3-triazóis (Figura 4). A escolha da sacarose como carboidrato justificou-se pelo custo relativamente baixo e por ser biodegradável e biocompatível. Entre as substâncias avaliadas, destacou-se a substância 1-(1',2,3,3',4,4',6-hepta-*O*-acetil-6'-desoxi-sucros-6'-il)-4-(4-bromofenil)-1,2,3-triazol que apresentou atividade antifúngica com faixa de CIM de 0,6 a 4,8 μM . Além disso, essa substância apresentou inibição de 50% do crescimento celular (GI_{50}) maior que 500 μM para cultura de células de fígado demonstrando baixa toxicidade para células normais (Petrova *et al.*, 2015).

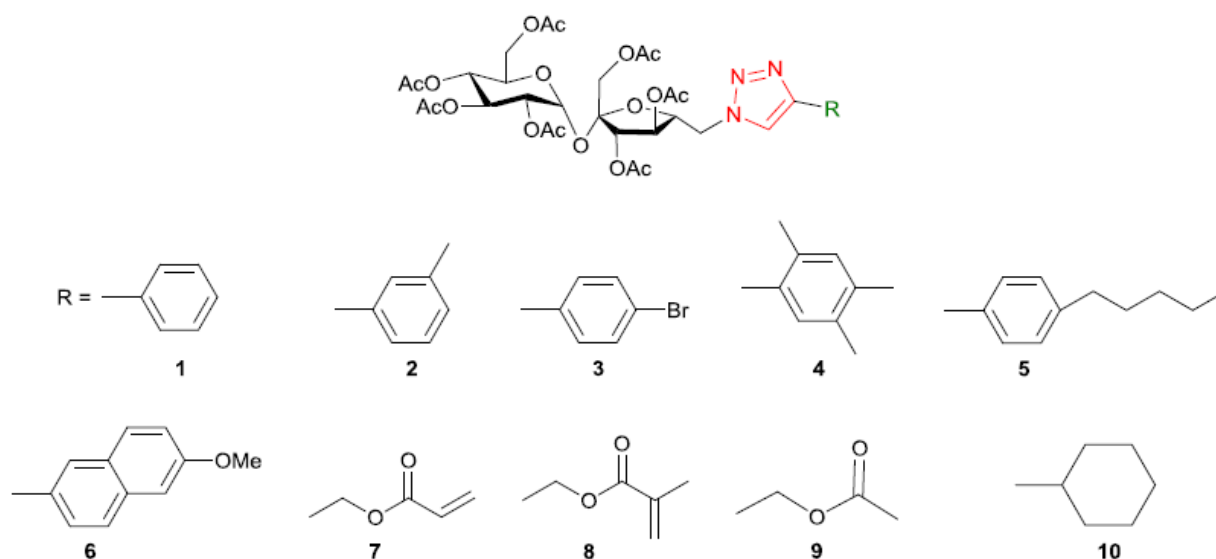


Figura 4. Estruturas da quimioteca de 1-(1',2,3,3',4,4',6-hepta-O-acetil-6'-desoxi-sucros-6'-il)-1,2,3-triazóis.

Fonte: (Petrova *et al.*, 2015)

Glicosidasas são um amplo e heterogêneo grupo de enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, capazes de hidrolisar ligações glicosídicas, sendo vitais para células eucariotas devido a sua importância para a formação das glicoproteínas e glicolípídeos. Portanto, enzimas dessa família com especificidade para fungos são alvos terapêuticos importantes a serem estudados. Em um estudo foi testado um heterociclo 1,2,3-triazol 1,4,5-trissubstituído conjugado com um a cinco resíduos de carboidratos. Essas moléculas mostram-se promissoras como inibidoras de glicosidasas, uma delas foi a substância 4,5-di-hidroxi-metil-1-(metil-4,6-didesoxi- α -D-glicopiranosid-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol (mostrada na Figura 5), a qual foi ativa para α -glicosidase e isomaltase de levedura, com constante de inibição (K_i) de 73 e 1925 μ M, respectivamente, as substâncias 1-[4,6-didesoxi- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicopiranos-4C-il]-5-[α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosiloximetil]-4-hidroxi-metil-1*H*-1,2,3-triazol e 1-[(4,6-didesoxi- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicopiranos-4C-il)]-4-[α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glicopiranosiloximetil]-5-hidroxi-metil-1*H*-1,2,3-triazol apresentaram K_i de 1158 e 1416 μ M respectivamente para α -glicosidase de levedura, já a substância 1-[4,6-didesoxi- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicopiranos-4c-il]-4-hidroxi-metil-5-[α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glicopiranosiloximetil]-

1*H*-1,2,3-triazol foi ativa para isomaltase de levedura, com K_i de 1028 μ M (Henrissat, 1991; Périon *et al.*, 2005; Harnpicharnchai *et al.*, 2009; Carvalho, 2010).

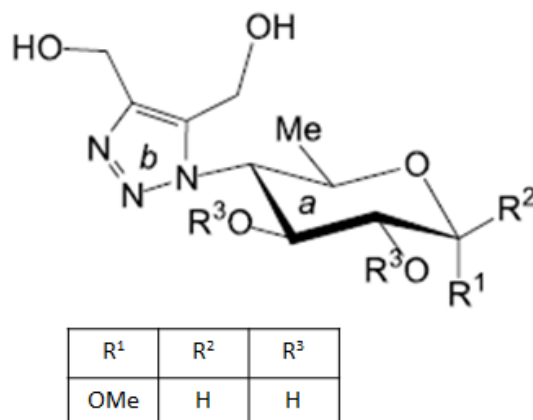


Figura 5. Estrutura 4,5-di-hidroximetil-1-(metil-4,6-didesoxi- α -D-glicopiranosid-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol, ativa para α -glicosidase e isomaltase de levedura.

Fonte: (Périon *et al.*, 2005)

Em um trabalho testou-se a atividade antimicrobiana de 14 derivados *N*- e *S*- β -D-glicosídicos conjugados com 1,2,4-triazóis (Figura 6 e Figura 7). Entre eles os derivados 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-4-amino-5-(piridin-3-il)-2,4-di-hidro-[1,2,4]-triazol-3-tiona, o 3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil-1-tio)-4-amino-5-(piridin-3-il)-4*H*-[1,2,4]-triazol, o 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-4-(4-metoxibenzilideneamino)-5-(piridin-3-il)-2,4-di-hidro-[1,2,4]-triazol-3-tiona, o 3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil-1-tio)-4-benzilidenoamino-5-(piridin-3-il)-4*H*-[1,2,4]-triazol, o 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-5-(piridin-3-il)-2,4-di-hidro-[1,2,4]-triazol-3-tiona e 2- β -D-glicopiranosil-5-(piridin-3-il)-2,4-di-hidro-[1,2,4]-triazol-3-tiona mostraram atividade inibitória contra *C. albicans*, nas concentrações de 1 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, mostrando-se promissores (Khalil, 2006).

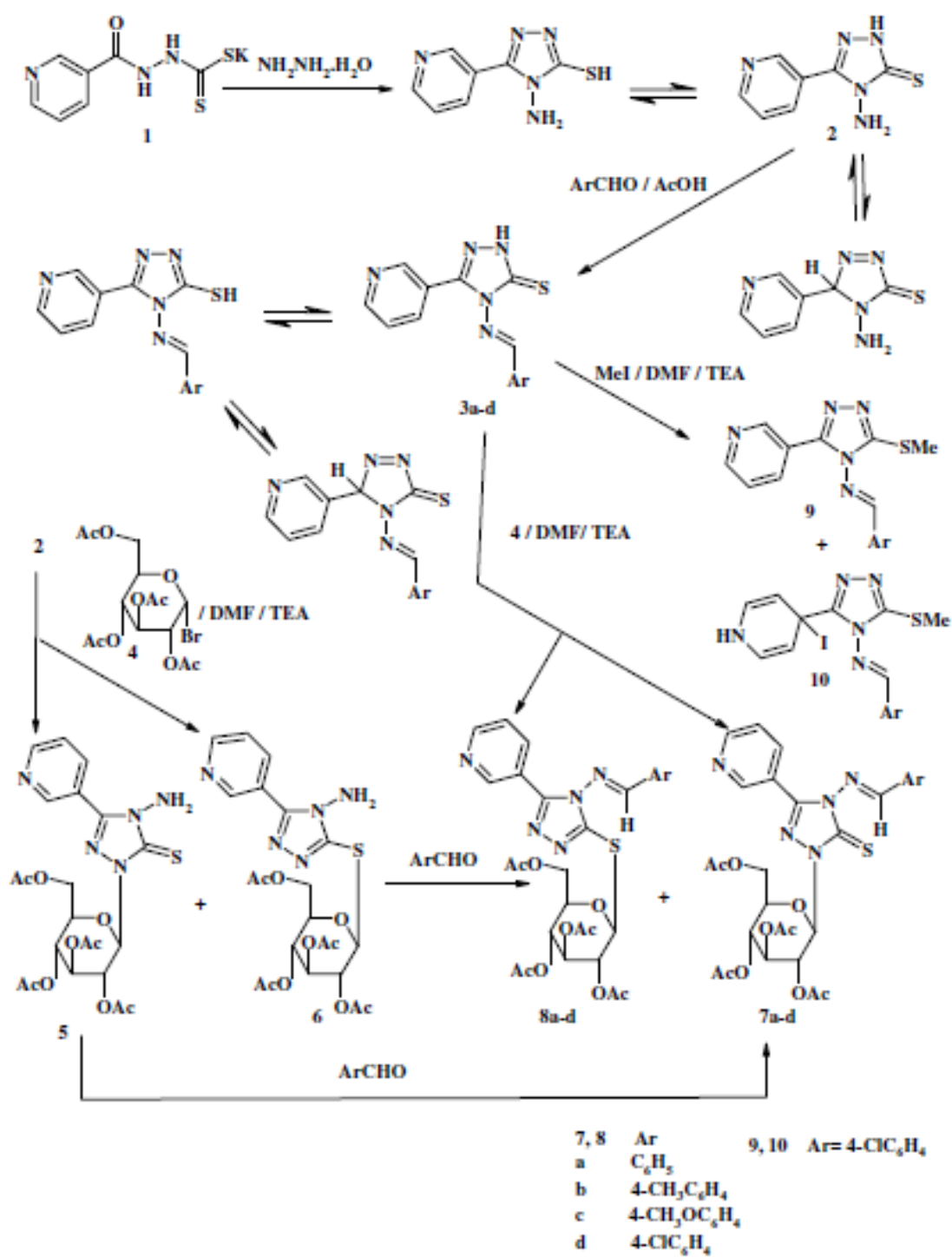


Figura 6. Derivados N- e S-β-D-glicosídicos conjugados com 1,2,4-triazóis de 1 à 10.

Fonte: (Khalil, 2006)

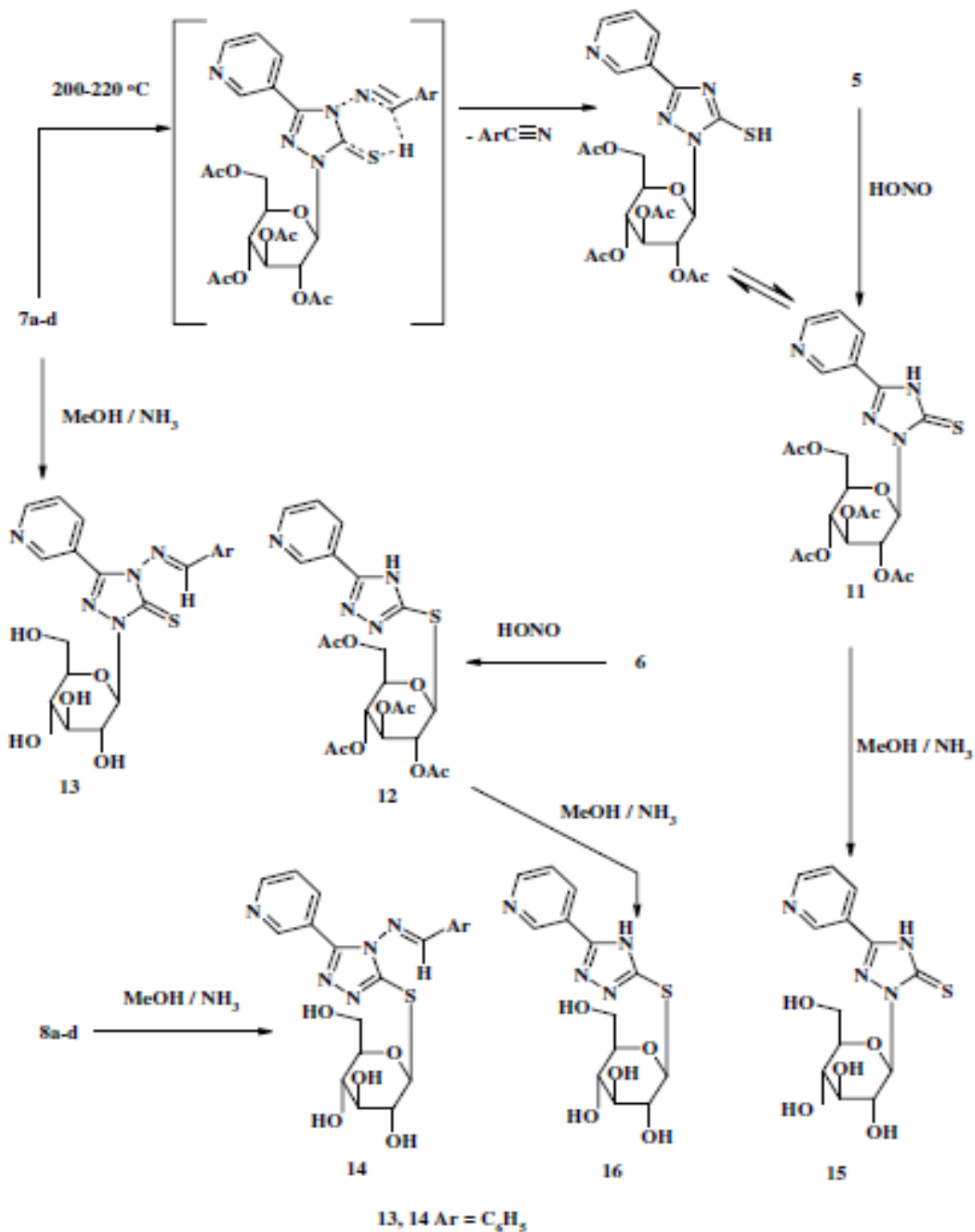


Figura 7. Derivados N- e S-β-D-glicosídicos conjugados com 1,2,4-triazóis de 11 à 16.

Fonte: (Khalil, 2006)

O óleo essencial de cravo é usado há muito tempo e suas atividades biológicas, grande parte atribuídas ao principal componente, que é o eugenol, tem sido validadas; entre

elas está a atividade antimicrobiana (Yadav *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2016). Glicosídeos de eugenol juntamente com glicosídeos de eugenol peracetilados foram sintetizados e testados contra *Candida* sp. Uma das substâncias testadas, a 4-alil-2-metoxifenil-(4',6'-*O*-benzil- β -D-glicopiranosídeo) (Figura 8), mostrou-se mais ativa que o fluconazol contra *C. glabrata*. Todos os derivados foram menos citotóxicos que o eugenol, sugerindo que a glicosilação é eficaz em reduzir a toxicidade para células eucarióticas (Souza *et al.*, 2014; De Souza *et al.*, 2016). A partir de um composto derivado de eugenol tetra-acetil-glicosídico, testado anteriormente pelo mesmo grupo e que se mostrou promissor, outros derivados de eugenol glicosilados foram sintetizados, na busca por compostos mais potentes, menos tóxicos, com melhor solubilidade e com o log P próximo ao ideal (menor que 5,0; Lipinski, 2001) para administração por via oral ou outras vias. O derivado 4-alil-2-metoxifenil-(4',6'-*O*-benzil- β -D-glicopiranosídeo) se mostrou menos eficaz que o eugenol tetra-acetil-glicosídico, mas mais potente que o fluconazol para *C. glabrata* e com baixa citotoxicidade (De Souza *et al.*, 2016).

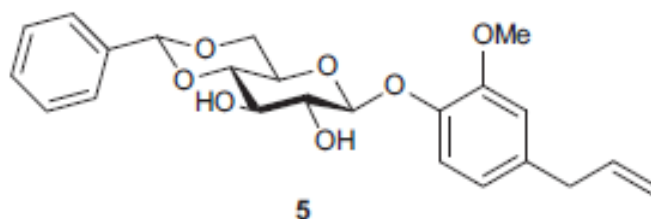


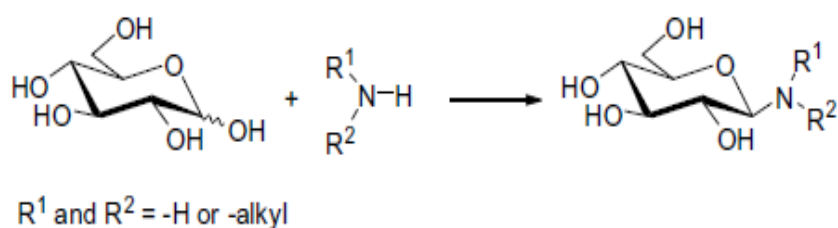
Figura 8. Estrutura 4-alil-2-metoxifenil-(4',6'-*O*-benzil- β -D-glicopiranosídeo).

Fonte: (De Souza *et al.*, 2016)

Tiocarbamatos glicosilados tiveram sua atividade antifúngica determinada para fungos patogênicos de plantas: *Fusarium graminearum*, *Rhizoctoria cerealis* e *Colletotrichum orbiculare*, em concentração de 500 μ g/mL. Alguns apresentaram fraca atividade ou uma atividade um pouco mais pronunciada, com porcentagens de inibição que variaram de 13,8-46,6% para *F. graminearum*, 0-58,3% para *R. cerealis* e 12,0-48,3% para *C. orbiculare*. O interessante deste estudo foi a possível correlação entre a estrutura e a atividade biológica. O número de átomos de carbono do álcool graxo usado para sintetizar os grupos tiocarbamatos de algumas das moléculas testadas foi determinante. Os compostos que possuíam átomos de carbono ímpares têm atividade antifúngica mais forte do que os compostos com átomos de carbono de número par. Também se constatou que a atividade

antifúngica de bis-tiocarbamatos é um pouco mais forte do que dos mono-tiocarbamatos (Zhou *et al.*, 2009).

Estudos também mostram que *N*-alquil- β -D-glicosilaminas (conforme figura 9) apresentam atividade antifúngica contra fungos de madeira, *Coriolus versicolor* e *Poria placenta*, com concentrações ativas variando de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol/mL e $2,5 \times 10^{-6}$ à $7,5 \times 10^{-5}$ mol/mL, respectivamente. O substituinte amino facilita a interação com o micro-organismo, aumenta a solubilidade em água e aumenta a atividade biológica, além de possuírem baixa toxicidade (Muhizi *et al.*, 2002; Walczewska *et al.*, 2015; Lingome *et al.*, 2014). Esta classe de derivados possui mais de um mecanismo de ação atribuído. Entretanto, muitos trabalhos os destacam como bons inibidores de glicosidases (Greenberg *et al.*, 1990; Muhizi *et al.*, 2008).



R^1	R^2
H	H
H	Ethyl
H	Butyl
H	Hexyl
H	Octyl
H	Dodecyl
H	2-Hydroxyethyl
2-Hydroxyethyl	2-Hydroxyethyl

Figura 9. Estrutura base *N*-alquil- β -D-glicosilamina com seus substituintes.

Fonte: (Muhizi *et al.*, 2008)

Estes derivados ainda possuem a vantagem de serem facilmente sintetizados a partir de recursos renováveis, como os açúcares (Nihei *et al.*, 2003; Muhizi *et al.*, 2008).

Sulfonamidas, já conhecidas por suas atividades biológicas, constituem um grupo de compostos que são utilizados como agentes antibacterianos (derivados Sulfanilamida),

antidiabéticos (Tolbutamida), diuréticos (Furosemida), analgésico (Celecoxibe) e anti-inflamatório (Sulfassalazina) (Poreba *et al.*, 2015). A bioatividade de *N*-glicosilssulfonamidas também vem se destacando. Derivados de carboidratos contendo sulfonamidas apresentaram atividade antitumoral importante. A ação *in vitro* contra linhagem de células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e adenocarcinoma de pulmão (A549) foi demonstrada, e observou-se que 2-acetil-D-eritro-hex-2-enopiranosil sulfonamida (Figura 10) apresentou maior potência. Outras atividades como anti-infecciosa, têm sido estudadas, entretanto os trabalhos encontrados são escassos (Crespo *et al.*, 2010).

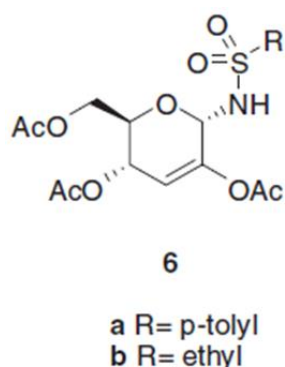


Figura 10. Estrutura 2-acetil-D-eritro-hex-2-enopiranosil sulfonamida.

Fonte: (Crespo *et al.*, 2010)

Novos fármacos, com mecanismos de ação diferentes dos já existentes e com menor toxicidade são importantes para combater infecções fúngicas, as quais estão sendo bastante prevalentes. Baseado nestes critérios e em estudos prévios demonstrados na literatura, substâncias contendo carboidratos podem apresentar um bom potencial para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Deste modo, a triagem de uma quimioteca de derivados de carboidratos do Prof. Dr. Ricardo José Alves da UFMG, pode ser interessante na busca por novos *hits*.

3. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica de derivados de carboidratos frente a espécies de *Candida*.

3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade de seis derivados de *N*-acetilglicosamina substituídos em diferentes posições frente a isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;
- Avaliar a atividade de quatro sulfonamidas: de *N*-acetilglicosamina e de glicose frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias ativas.

4. Materiais e métodos

4.1. Obtenção dos Carboidratos

Para a realização deste estudo foram utilizadas duas classes distintas de carboidratos: derivados *N*-acetilglicosamina substituídos em diferentes posições (Tabela 1) e sulfonamidas de *N*-acetilglicosamina e de glicose (Tabela 2). Os derivados pertencem a quimioteca do Laboratório de Química Farmacêutica (Faculdade de Farmácia, UFMG) e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Ricardo José Alves para o Laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (Faculdade de Farmácia, UFRGS).

4.2. Seleção dos Micro-Organismos

Para a realização do estudo, foram selecionados: um isolado de *C. albicans* (ATCC 18804), dois isolados de *C. glabrata* (CG RL12m, CG 09), dois isolados de *C. parapsilosis* (CP RL33, CP RL47), dois isolados de *C. krusei* (CK 01, ATCC 6258) e um isolado de *C. tropicalis* (CT 72A). Todos os isolados foram identificados fenotipicamente através do sistema automatizado Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieuxVitek, Hazelwood, Mo.). São isolados originados de cateter, urina, candidíase oral, ou são provenientes do Programa Nacional de Controle de Qualidade. Todos pertencem à coleção de fungos (micoteca) do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada da UFRGS. Os isolados são armazenados em geladeira e cultivados em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (SDA; Himedia), acrescidos de óleo mineral em sua superfície.

4.3. Preparo das Soluções Teste Contendo os Derivados de Carboidratos

As moléculas foram pesadas, dissolvidas com 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, tamponado com ácido morfolinopropano sulfônico (MOPS) e pH 7,0. Para o *screening* antifúngico, as moléculas foram diluídas na concentração de 256 µg/mL e para a determinação da concentração inibitória mínima elas foram diluídas a 1024 µg/mL.

Tabela 1. Derivados de *N*-acetilglicosamina

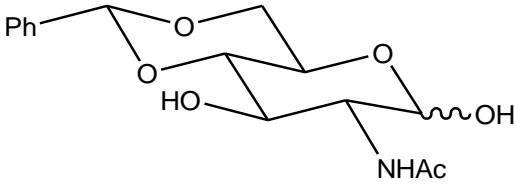
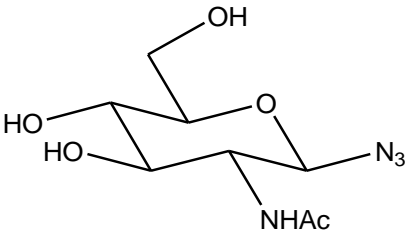
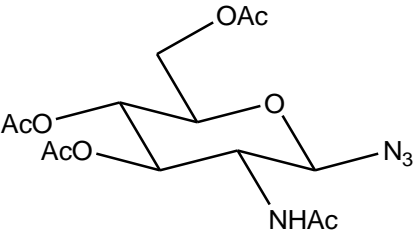
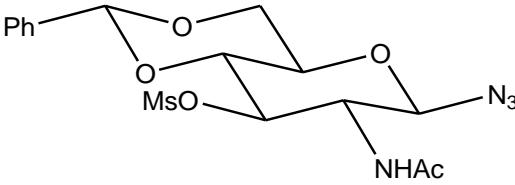
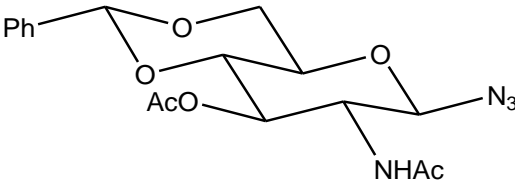
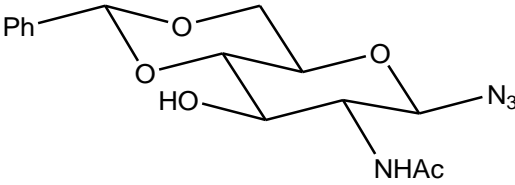
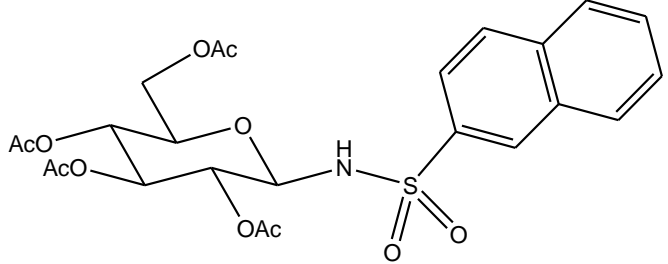
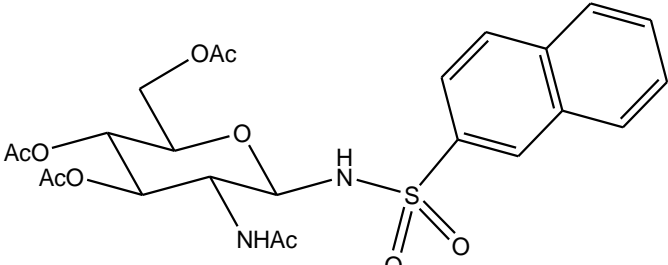
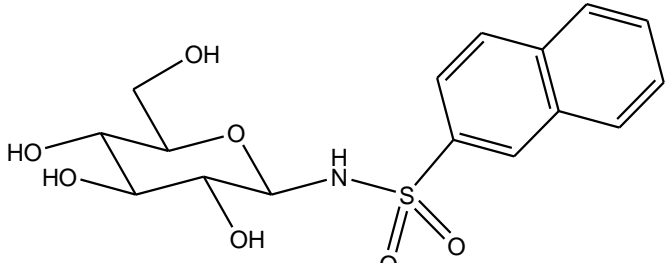
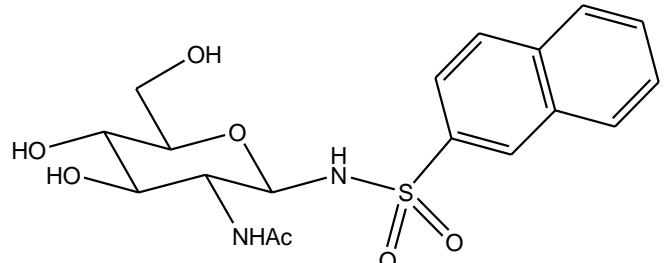
Substância	Fórmula Estrutural	Massa Molar / g.mol ⁻¹
1		309,31
2		249,22
3		372,33
4		412,41
5		376,36
6		334,33

Tabela 2. Sulfonamidas de *N*-acetilglicosamina e sulfonamidas de glicose

Substância	Fórmula Estrutural	Massa Molar / g.mol ⁻¹
7		537,54
8		536,55
9		369,39
10		410,44

4.4. Teste de Suscetibilidade

Primeiramente, um *screening* antifúngico foi realizado utilizando uma concentração fixa de 128 µg/mL dos derivados da *N*-acetilglicosamina e *N*-glicosilssulfonamidas frente a espécies de *Candida*. Nos casos em que se verificaram atividade antifúngica (inibição total ou parcial do fungo) no *screening*, foram realizados testes de microdiluição em caldo para

determinação das CIMs. A técnica da microdiluição em caldo foi realizada de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

4.4.1. Preparo do Inóculo

Os isolados foram cultivados em SDA e incubados a 35 °C por 24 h. Após, as células foram suspensas em solução salina 0,9% estéril e ajustadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, para se obter transmitância equivalente ao tubo 0,5 na escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células/mL), ou seja, 90% de transmitância. Então, a partir desta suspensão, foi realizada uma diluição 1:50 em salina estéril e a seguir uma diluição 1:20 em caldo RPMI 1640, resultando em concentração 0,5 a $2,5 \times 10^3$ céls/mL (CLSI, M27-A3, 2008).

4.4.2. Microdiluição em Caldo

A microdiluição em caldo foi realizada em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços (dispostos em 12 colunas e 8 linhas). As soluções preparadas contendo as moléculas estavam duas vezes mais concentradas (1024 µg/mL) e foram depositadas numa quantidade de 200 µL, na primeira coluna da microplaca e microdiluições seriadas em caldo RPMI 1640 foram realizadas até a décima coluna, totalizando 100 µL de 10 concentrações teste para cada molécula. Cada inóculo fúngico foi depositado nos poços já contendo igual volume da respectiva solução teste, em volume de 100 µL. Na 11ª coluna foi feito o controle de crescimento fúngico, ou seja, foi adicionado apenas meio de cultura RPMI 1640 e inóculo fúngico; na 12ª coluna foi pipetado apenas meio RPMI 1640, servindo como controle de esterilidade do ensaio. Controle com DMSO 2% já havia sido feito em experimentos anteriores com os isolados clínicos aqui estudados. Os testes foram realizados em triplicatas (três linhas de poços) e as microplacas incubadas a 35 °C por 24 horas, para posterior leitura e determinação da CIM. A leitura foi realizada visualmente. A faixa de concentração teste das moléculas em solução foi 512 µg/mL à 1 µg/mL.

4.4.3. Leitura e Interpretação dos Resultados

A leitura para determinar a CIM foi realizada visualmente. A CIM dos derivados de carboidratos foi considerada como a menor concentração na qual houve inibição total do crescimento fúngico em 24 horas. A CIM capaz de inibir 50% do crescimento fúngico também foi determinada, comparando-se ao controle de crescimento (controle sem tratamento).

5. Resultados e Discussão

As dez substâncias foram testadas em um *screening* e a partir dos resultados, as moléculas que se mostraram ativas tiveram suas CIMs determinadas.

Em nosso trabalho, dos seis derivados da *N*-acetilglicosamina substituídos em diferentes posições testados no *screening*, apenas uma molécula da série (substância **1**) mostrou-se ativa, inibindo dois dos isolados testados, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3. *Screening* da atividade antifúngica de derivados da *N*-acetilglicosamina substituídos em diferentes posições frente a espécies de *Candida*.

Isolados	Derivados da <i>N</i> -acetilglicosamina					
	1	2	3	4	5	6
CG RL12m	A	NA	NA	NA	NA	NA
CG 09	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CT 72A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CP RL33	A	NA	NA	NA	NA	NA
CP RL47	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CK 01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CK ATCC 6258	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CA ATCC 18804	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA: não ativa (sem capacidade de inibir o crescimento fúngico na concentração de 128 µg/mL); A: ativa (apresentou capacidade de inibir o crescimento fúngico na concentração de 128 µg/mL); CG: *Candida glabrata*; CT: *Candida tropicalis*; CP: *Candida parapsilosis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*.

Da mesma forma, das quatro sulfonamidas de *N*-acetilglicosamina e de glicose testados no *screening*, apenas uma molécula da série (substância **7**) mostrou-se ativa, inibindo um dos isolados testados, conforme mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Screening da atividade antifúngica de sulfonamidas de *N*-acetilglicosamina e de glicose frente a espécies de *Candida*.

Isolados	Sulfonamidas de <i>N</i> -acetilglicosamina e de glicose			
	7	8	9	10
CG RL12m	NA	NA	NA	NA
CG 09	NA	NA	NA	NA
CT 72A	NA	NA	NA	NA
CP RL33	A	NA	NA	NA
CP RL47	NA	NA	NA	NA
CK 01	NA	NA	NA	NA
CK ATCC 6258	NA	NA	NA	NA
CA ATCC18804	NA	NA	NA	NA

NA: não ativa (sem capacidade de inibir o crescimento fúngico na concentração de 128 µg/mL), A: ativa (apresentou capacidade de inibir o crescimento fúngico na concentração de 128 µg/mL); CG: *Candida glabrata*; CT: *Candida tropicalis*; CP: *Candida parapsilosis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*.

As CIMs destas moléculas foram determinadas e os valores estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das substâncias ativas (1 e 7) obtidas para 100% e 50% de inibição fúngica em 24 horas.

Isolados	Substância 1				Substância 7			
	50% Inibição		100% Inibição		50% inibição		100% inibição	
	CIM (µg/mL)	CIM (µmol/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µmol/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µmol/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µmol/mL)
CG RL12m	< 128 e > 64	< 0,414 e > 0,207	128	0,414	> 512	> 0,953	> 512	> 0,953
CP RL33	128	0,414	256	0,828	32	0,06	> 512	> 0,953

CG: *Candida glabrata*; CT: *Candida tropicalis*; CP: *Candida parapsilosis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*.

Apesar da substância 1 ter inibido apenas dois isolados e a substância 7 apenas um isolado, estes resultados tem importante valor, uma vez que o isolado CG RL12m é resistente ao fluconazol, itraconazol e cetoconazol; e CP RL33 é resistente ao miconazol e apresentou sensibilidade dose dependente ao itraconazol, conforme é apresentado na Tabela 6. A resistência ao fluconazol e itraconazol foi definida de acordo com M27-S4 (CLSI, 2012) e M27-A3 (CLSI, 2008); a resistência ao cetoconazol foi definida conforme

Bremenkamp et al. (2011) e a resistência ao miconazol foi definida conforme Isham & Ghannoum (2010). Esses fármacos são amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por *Candida* e isto, possivelmente, representaria falha na terapia.

Tabela 6. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de antifúngicos azólicos.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol	Miconazol
CG RL12m	64 (R)	1 (R)	> 8 (R)	0,5 (S)
CP RL33	1 (S)	0,25 (SDD)	0,03125 (S)	> 8 (R)

CG: *Candida glabrata*; CT: *Candida tropicalis*; CP: *Candida parapsilosis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*; R: resistente; S: sensível; SDD: sensível dose dependente.

Outros estudos também mostram que derivados de glicosaminas apresentam atividade antifúngica contra fungos patogênicos, como *C. tropicalis*, *C. albicans* e *Aspergillus niger*, apresentando CIMs de 0,5 à 128 $\mu\text{g/mL}$, 2,0 à 128 $\mu\text{g/mL}$ e 8,0 à 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Walczewska *et al.*, 2015).

Além disso, glicosilaminas também apresentaram atividade contra fungos de madeira - *Coriolus versicolor* e *Poria placenta* - com concentrações ativas variando de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol/mL e $2,5 \times 10^{-6}$ a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/mL, respectivamente. Comparando-se com os valores de CIM encontradas em nosso trabalho, podemos observar que os valores que encontramos são menores, os quais variaram de $6,0 \times 10^{-8}$ à $8,28 \times 10^{-7}$ mol/mL, o que pode indicar maior potência. Entretanto cabe destacar que são gêneros fúngicos distintos, o método utilizado pelos autores foi halo de inibição, divergindo da metodologia usada neste trabalho e, por isso, estudos com as mesmas espécies são necessários para comparação dos resultados. Ainda observou-se que a atividade é dependente da concentração e que o aumento da cadeia alquílica aumenta a atividade, provavelmente pelo acréscimo de hidrofobicidade e pelo caráter tensoativo conferido pela cadeia alquílica longa, o que aumenta afinidade pelos receptores (Nihei *et al.*, 2003; Muhizi *et al.*, 2008). O estudo também demonstrou que a adição de um grupo hidroxila no substituinte de C-1 também influenciou positivamente a atividade, porém não há aumento significativo com a adição de um segundo grupo hidroxila (Muhizi *et al.*, 2008).

Comparando a atividade do composto **1** com a atividade do composto **6** é possível determinar uma relação estrutura atividade clara. A substituição da hidroxila ligada ao carbono anomérico pelo grupo azida levou a inatividade de **6**. Com base neste resultado, infere-se que é importante a presença da hidroxila em C1. Comparando com os resultados descritos para os derivados de glicosilaminas, sugere-se que a substituição da hidroxila em C-1 por um grupo amino poderia ser tolerada. Logo, será interessante sintetizar os derivados substituídos com um grupo amino em C-1.

Em estudo avaliando a atividade antifúngica contra *C. glabrata*, observou-se que grupos hidroxilas livres podem favorecer a solubilidade em água, conferem hidrofília, enquanto que grupos benzilas ou acetilas conferem lipofília. Estes poderiam ser necessários para a passagem na membrana de fungos. Neste estudo uma molécula, 4-alil-2-metoxifenil-(4',6'-*O*-benzil- β -D-glicopiranosídeo), a qual possui as características citadas acima, além de uma baixa citotoxicidade, mostrou atividade anti-*Candida*, especificamente contra *C. glabrata*, com resultados superiores ao fluconazol, ao qual foi comparada (De Souza *et al.*, 2016). Isso nos indica, novamente, que a adição de um grupo lipofílico não muito volumoso na hidroxila livre do carbono anomérico, por conseguinte, pode gerar acréscimo na sua atividade, pois o aumento da lipofília poderia melhorar a penetração na membrana fúngica.

Em relação às sulfonamidas também foram obtidos resultados interessantes. Neste caso foi possível também determinar algumas características importantes para atividade desta classe. Apenas o derivado peracetilado da glicose **7** foi ativo. Deste modo, conclui-se que a substituição da glicose por *N*-acetilglicosamina não é bem tolerado neste caso. Além disso, a desacetilação leva a derivados inativos também indicando que sulfonamidas mais lipofílicas são importantes para a atividade destes derivados. Utilizando a substância **7** como protótipo, poderíamos variar extensivamente o substituinte naftil da sulfonamida na tentativa de otimizar a atividade destes compostos.

6. Conclusão

Diante do apresentado, podemos concluir que as substâncias **1** e **7** mostraram-se potenciais protótipos para agentes antifúngicos. Estas moléculas demonstram atividade frente a espécies de *Candida* que apresentam importantes problemas relacionados à resistência aos antifúngicos, comumente utilizados na terapia. Ainda, estas representam um grave problema de saúde pública, pois estão relacionadas à altos índices de morbidade e mortalidade.

Dessa forma, podemos inferir que essas moléculas podem ser quimicamente alteradas a fim de potencializar sua atividade antifúngica. Entretanto, são estudos muito preliminares, sendo necessárias pesquisas mais aprofundadas, com avaliação da toxicidade e mecanismo de ação. Análises mais detalhadas sobre a relação estrutura-atividade e melhoramento do processo de síntese são importantes para otimização destas moléculas.

7. Referências Bibliográficas

AHMED, A.; AZIM, A.; BARONIA, A. K.; MARAK, K. R. S. K.; GURJAR, M. Risk prediction for invasive candidiasis. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, vol. 18, n. 10, p. 682-688, 2014.

ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; ORTIGOSA, C. J.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; PFALLER, M. A. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of *FKS* Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. **Clinical Infectious Disease**, vol. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.

ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia em hospital terciário brasileiro: distribuição das espécies e padrões de susceptibilidade aos antifúngicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.

AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.

ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidaemia, Susceptibility and Epidemiology. **Danish Medical Journal**, vol. 60, n. 11, 2013.

ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem?. **PubMed Central - Curr Opin Infect Dis**, vol. 27, n. 6, p. 484-492, 2014.

BABAK, S. D. S.; BABAK, T.; DIEZMANN, S.; HILL, J. A.; XIE, J. L.; CHEN, Y. L.; POUTANEN, S. M.; RENNIE, R. P.; HEITMAN, J.; COWEN, L. E. Global Analysis of the Evolution and Mechanism of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*. **PLoS Pathog**, vol. 8, n. 5, 2012.

BERGMAN, A.M.; KUIPER, C.M.; VOORN, D.A.; COMIJN, E.M.; MYHREN, F.; SANDVOLD, M.L.; HENDRIKS, H.R.; PETERS, G.J. Antiproliferative activity and mechanism of action of fatty acid derivatives of arabinofuranosylcytosine in leukemia and solid tumor cell lines. **Biochemical Pharmacology**, vol. 67, n. 3, p. 503-511, 2004.

BOLARDA, J.; JOLYB, V.; YENIB, P. Mechanism of Action of Amphotericin B at the Cellular Level. Its Modulation by Delivery Systems. **Journal of Liposome Research**, vol. 3, n. 3, p. 409-427, 1993.

BRADNER, W.T; CLARKE, D.A; STOCK, C.C, Stimulation of host defense experimental câncer. I. Zymosan and Sarcoma 180 in mice. **Cancer Research**. vol. 18, p. 34, 1958.

BREMENKAMP, R. M.; CARIS, A. R.; JORGE, A. O. C.; BACK-BRITO, G. N.; MOTA, A. J.; BALDUCCI, I.; BRIGHENTI, F. L.; KOGA-ITO, C. Y. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. **Archives of Oral Biology**, vol. 56, n. 6, p. 549–555, 2011.

BRITO, L. R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; ALMEIDA, L. P.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, vol. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, vol. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CARVALHO, A. F. A. Purificação e caracterização bioquímica da α -glicosidase termoestável produzida por *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. 2010. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponível em <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acessado em: 08 Março/2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Document M27-A3.3rd ed. Wayne, PA: CLSI; 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Document M27-S4. Wayne, PA: CLSI; 2012.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; SKAGGS, B. A.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.

COSTA, S. F.; MARINHO, I.; ARAÚJO, E. A. P.; MANRIQUE, A. E. I.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVIN, A. S. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. **Journal of Hospital Infection**, vol. 45, n. 1, p. 69–72, 2000.

CRESPO, R.; DE BRAVO, M. G.; COLINAS, P. A.; BRAVO, R. D. *In vitro* antitumor activity of *N*-glycosyl sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 20, n. 22, p. 6469-6471, 2010.

CRUCHO, C. I. C.; DA SILVA, P. C.; PETROVA, K. T.; BARROS, M. T. Recent progress in the field of glycoconjugates. **Carbohydrate Research**, vol. 402, p. 124–132, 2015.

DA SILVA, F. C.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FRUGULHETTI, I. I. P.; CASTRO, H. C.; SOUZA, S. L. O.; DE SOUZA, T. M. L.; RODRIGUES, D. Q.; SOUZA, A. M. T.; ABREU, P. A.; PASSAMANI, F.; RODRIGUES, C. R.; FERREIRA, V. F. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 44, n. 1, p. 373-383, 2009.

DANNAOUI, E.; OLLIVIER, M. D.; HERMOSO, D. G.; GRENOUILLET, F.; CASSAING, S.; BAIXENCH, M. T.; BRETAGNE, S.; DROMER, F.; LORTHOLARY, O. *Candida* spp. with Acquired Echinocandin Resistance, France, 2004–2010. **Emerging Infectious Disease**, vol. 18, n. 1, p. 86–90, 2012.

DE SOUZA, T. B.; BRITO, K. M. O.; SILVA, N. C.; ROCHA, R. P.; DE SOUSA, G. F.; DUARTE, L. P.; COELHO, L. F. L.; DIAS, A. L. T.; VELOSO, M. P.; CARVALHO, D. T.; DIAS, D. F. New Eugenol Glucoside-based Derivative Shows Fungistatic and Fungicidal Activity against Opportunistic *Candida glabrata*. **Chemical Biology & Drug Design**, vol. 87, n. 1, p. 83-90, 2016.

DE SOUZA, T. B.; ORLANDI, M.; COELHO, L. F. L.; MALAQUIAS, L. C. C.; DIAS, A. L. T.; DE CARVALHO, R. R.; SILVA, N. C.; CARVALHO, D. T. Synthesis and *in vitro* evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, vol. 23, n. 1, p. 496-502, 2014.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, vol. 362, n. 9390, p. 1142–1151, 2003.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, vol. 18, n. 5, p. 195–204, 2010.

DEVULAPALLE, K. S.; DE SEGURA, A. G.; FERRER, M.; ALCALDE, M.; MOOSER, G.; PLOU, F. J. Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. **Carbohydrate Research**, vol. 339, n. 6, p. 1029-1034, 2004.

DODGSON, K. J.; DODGSON, A. R.; PUJOL, C.; MESSER, S. A.; SOLL, D. R.; PFALLER, M. A. Caspofungin resistant *C. glabrata*. In: **15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, 2005**.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; DA MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS ONE**, vol. 11, n. 1, 2016.

DUARTE, J. M.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, ^a L.; MOYA, L. T.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J.

Comparison of Caspofungin and Amphotericin B for Invasive Candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, vol. 347, p. 2020-2029, 2002.

ECDC/EMA JOINT TECHNICAL REPORT - The bacterial challenge: time to react A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agentes. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf> Acessado em: 25 Abril/2016.

ENOCH, D. A.; LUDLAM H. A.; BROWN N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 55, p. 809–818, 2006.

ESTRELLA, M. C.; RODERO, L.; EFFRÓN, G. G.; TUDELA, J. L. R. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996–1999. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 49, n. 6, p. 981-987, 2002.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 9, p. 109-118, 2011.

FLEVARI, A.; THEODORAKOPOULOU, M.; VELEGRAKI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, vol. 8, p. 1199-208, 2013.

GREENBERG, P.; MERRILL, A. H.; LIOTTA, D. C.; GRABOWSKI, G. A. Human acid β -glucosidase: use of sphingosyl and *N*-alkyl-glucosylamine inhibitors to investigate the properties of the active site. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, vol. 1039, n. 1, p. 12-20, 1990.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia sp.*, with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, vol. 67, n. 2, p. 61-69, 2009.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, vol. 280, n. 2, p. 309-316, 1991.

HOEPRICH, P. D.; INGRAHAM, J. L.; KLEKER, E.; WINSHIP, M. J. Development of Resistance to 5-Fluorocytosine in *Candida parapsilosis* during Therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 130, n. 2, p. 112-118, 1974.

ISHAM, N.; GHANNOUM, M. A. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. **Mycoses**, vol. 53, n. 5, p. 434-437, 2010.

IZQUIERDO, A. A.; MELHEM, M. S. C.; BONFIETTI, L. X.; TUDELA, J. L. R. Susceptibility test for fungi: Clinical and Laboratorial correlations in Medical Mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 57, suplemento 19, p. 57–64, 2015.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KAUFFMAN, C. A. Clinical efficacy of new antifungal agents. **Curren Opinion in Microbiology**, vol. 9, n. 5, p. 483–488, 2006.

KHALIL, N. S. A. M. Efficient synthesis, structure and antimicrobial activity of some novel *N*- and *S*- β -D-glucosides of 5-pyridin-3-yl-1,2,4-triazoles. **Carbohydrate Research**, vol. 341, n. 13, p. 2187-2199, 2006.

KOFTERIDIS, D. P.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Caspofungin-non-susceptible *Candida* isolates in cancer patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 65, n. 2, p. 293-295, 2010.

KRCMERY, V.; BARNESZ, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, vol. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.

LEONETI, V. A.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper (I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) ‘click chemistry’ in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**, vol. 66, n. 49, p. 9475-9492, 2010.

LICHTENTHALER, F. W.; PETERS, S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. **Comptes Rendus Chimie**, vol. 7, n. 2, p. 65-90, 2004.

LINGOME, C. E.; POURCEAU, G.; DEVEAUX, V. G.; WADOUACHI, A. Efficient synthesis of glycosylamines in solventless conditions promoted by mechanical milling. **RSC Advances**, vol. 4, n. 68, p. 36350-36356, 2014.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 46, p. 3–26, 2001.

LOCKHART, S. R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, vol. 36, n. 17, p. 131–136, 2014.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; BOLDEN, C. B.; BAUGHMAN, W.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; PARK, B. J.;

CHILLERA, T. Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 50, n.11, p. 3435-3442, 2012.

LORTHOLARY, O.; RENAUDAT, C.; SITBON, K.; MADEC, Y.; NDAM, L. D.; WOLFF, M.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). **Intensive Care Medicine**, vol. 40, n. 9, p. 1303-1312, 2014.

LYON, G. M.; KARATELA, S.; SUNAY, S.; ADIRI, Y. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the *Candida* Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 48, n. 4, p. 1270–1275, 2010.

MADSEN, K. M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clinical Infectious Disease**, vol. 42, n. 7, p. 938-944, 2006.

MAGILL, S. S.; SHIELDS, C.; SEARS, C. L.; CHOTI, M.; MERZ, W. G. Triazole Cross-Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 44, n. 2, p. 529–535, 2006.

MARICHAL, P.; KOYMANS, L.; WILLEMSSENS, S.; BELLENS, D.; VERHASSELT, P.; LUYTEN, W.; BORGERS, M.; RAMAEKERS, F. C. S.; ODDS, F. C.; BOSSCHE, H. V. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14- α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, vol. 145, n. 10, p. 2701-2713, 1999.

MARTINS, P. **Epidemiologia das Infecções Hospitalares em Centro de Terapia Intensiva de Adulto**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2006.

MATSUMOTO, E.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; MCDANEL, J.; CASTANHEIRA, M.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. Candidemia surveillance in Iowa: emergence of echinocandin resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol.79, n.2, p.205-208, 2014.

MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural e atividade biológica de carboidratos de *Phyllanthus niruri* (QUEBRA-PEDRA)**. 2006. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, vol. 2, n. 4, p. 254–259, 2014.

MORGAN, J.; MELTZER, M. I.; PLIKAYTIS, B. D.; SOFAIR, A. N.; WHITE, S. H.; WILCOX, S.; HARRISON, L. H.; SEABERG, E. C.; HAJJEH, R. A.; TEUTSCH, S. M. Excess mortality, Hospital Stay, and cost due to candidemia: a case–control study using data

from population-based Candidemia surveillance. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, vol. 26, n. 6, p. 540-547, 2005.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Multiechinocandin and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, vol. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.

MUHIZI, T.; COMA, V.; GRELIER, S. Synthesis and evaluation of *N*-alkyl- β -D-glucosylamines on the growth of two wood fungi, *Coriolus versicolor* and *Poria placenta*. **Carbohydrate Research**, vol. 343, p. 2369-2375, 2008.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 46, n. 1, p. 153, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010.

NASCIMENTO, A. B.; CAMARGO, C. H.; MONDELLI, A. L.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; BAGAGLI, E. *Candida* species biofilm and *Candida albicans* ALS3 polymorphisms in clinical isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 45, n. 4, p. 1371-1377, 2014.

NIHEI, K.; NIHEI, A.; KUBO, I. Rational Design of Antimicrobial Agents: Antifungal Activity of Alk(en)yl Dihydroxybenzoates and Dihydroxyphenyl Alkanoates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 13, n. 22, p. 3993-3996, 2003.

NOGUEIRA, C. M.; PARMANHAN, B. R.; FARIAS P. P.; CORRÊA, A. G. A. Importância Crescente dos Carboidratos em Química Medicinal. **Revista Virtual de Química**, vol. 1, n. 2, p. 149-159, 2009.

NUCCI, M.; TELLES, F. Q.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, vol. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

OLIVEIRA, F. B. M.; LIMA, L. M.; MOURA, M. E. B.; NUNES, B. M. V. T.; OLIVEIRA, B. M. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, vol. 4, n. 4, p. 72-77, 2011.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE1, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 37, n. 5, p. 634-643, 2003.

PARK, J. B.; CHILLER, M.T.; BRANDT, E.M.; WARNOCK, W. D. Epidemiology of Systemic Fungal Diseases: An Overview. **Essentials of Clinical Mycology**, p. 27-37, 2011.

PÉRIION, R.; FERRIÈRES, V.; MORENO, M. I. G.; MELLET, C. O.; DUVAL, R.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; PLUSQUELLEC, D. 1,2,3-Triazoles and related glycoconjugates as new glycosidase inhibitors. **Tetrahedron**, vol. 61, n. 38, p. 9118-9128, 2005.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, vol. 10, n. 3, p. 121–130, 2007.

PETROVA, K.T.; POTEWAR T. M.; CORREIA, P. S.; BARROS M. T.; CALHELHA, R. C.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; FERREIRA, C. F. R. I. Antimicrobial and cytotoxic activities of 1,2,3-triazole-sucrose derivatives. **Carbohydrate Research**, vol. 417, p. 66–71, 2015.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, vol. 125, n. 1A, p. S3–S13, 2012.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; EDMOND, M. B.; WENZEL, R. P. National Surveillance of Nosocomial Blood Stream Infection Due to *Candida albicans*: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibility in the SCOPE Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 31, n. 1, p. 327-332, 1998.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010.

PFALLER, M. A.; MESSER, A. S.; WOOSLEY, L. N.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Echinocandin and Triazole Antifungal Susceptibility Profiles for Clinical Opportunistic Yeast and Mold Isolates Collected from 2010 to 2011: Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values for Characterization of Geographic and Temporal Trends of Antifungal Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 51, n. 8, p. 2571–2581, 2013.

POREBA, K.; PAWLIK, K.; REMBACZ, K. P.; KUROWSKA, E.; MATUSZYK, J.; DLUGOSZ, A. Synthesis and Antibacterial Activity of New Sulfonamide Isoxazolo[5,4-B]Pyridine Derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, vol. 72, n. 4, p. 727-735, 2015.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; BARRY, A. L.; NELSON, P. W.; WEBB, C. D. Antifungal Susceptibility Testing of Isolates from a Randomized, Multicenter Trial of Fluconazole versus Amphotericin B as Treatment of Nonneutropenic Patients with Candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 39, n. 1, p. 40-44, 1995.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; BARRY, A. L.; NELSON, P. W.; WEBB, C. D. Antifungal Susceptibility Testing of Isolates from a Randomized, Multicenter Trial of Fluconazole versus Amphotericin B as Treatment of Nonneutropenic Patients with Candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 39, n. 1, p. 40-44, 1995.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* Species to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 39, n. 1, p. 1-8, 1995.

RODERO, L.; DAVEL, G.; CÓRDOBA, S.; SORIA, M.; CANTEROS, C.; HOCHENFELLNER, F. Multicenter study on nosocomial candidiasis in the Republic of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, vol. 31, n. 3, p. 114-119, 1999.

RODERO, L.; DAVEL, G.; SORIA, M.; VIVOT, W.; CÓRDOBA, S.; CANTEROS, C. E.; SAPORITI, A. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, vol. 37, n. 4, p. 189-195, 2005.

SAGUÉ, C. M.B.; JARVIS, W. R. Secular Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the United States, 1980-1990. **The Journal of Infectious Disease**, vol. 167, n. 5, p. 1247-1251, 1993.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, T.; FADDA, G. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 49, n. 2, p. 668-679, 2005.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKÄINEN, O.; SOLL, D. R.; PUJOL, C.; PFALLER, M. A.; RICHARDSON, M.; KÄHKÖLÄ, P. K.; LUUKKAINEN, P.; SAXÉN, H. Emergence of Fluconazole Resistance in a *Candida parapsilosis* Strain That Caused Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 43, n. 6, p. 2729-2735, 2005.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. **Medical Mycology**, vol. 42, n. 4, p. 333-339, 2004.

SMEGO, R. A. J.; PERFECT, J. R.; DURACK, D.T. Combined therapy with amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida* meningitis. **Reviews of Infectious Diseases**, vol. 6, n. 6, p. 791-801, 1984.

SPREGHINI, E.; ORLANDO, F.; SANTINELLI, A.; PISA, E.; LORETELLI, C.; MANZO, E.; MILICI, M. E.; SCALISE, G.; BARCHIESI, F. Anidulafungin in Combination with Amphotericin B against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 53, n. 9, p. 4035–4039, 2009.

Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:398–405.

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

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, vol.21, n. 4, p.606–625, 2008.

TUNKEL, A. R.; THOMAS, C. Y.; WISPELWEY, B. *Candida* prosthetic arthritis: report of a case treated with fluconazole and review of the literature. **The American Journal of Medicine**, vol.94, n.1, p.100–103, 1993.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, vol. 2012, 26 páginas, 2011.

WALCZEWSKA, A.; GRZYWACZ, D.; BEDNARCZYK, D.; DAWGUL, M.; NOWACKI, A.; KAMYSZ, W.; LIBEREK, B.; MYSZKA, H. *N*-Alkyl derivatives of diosgenyl 2-amino-2-deoxy- β -D-glucofuranoside; synthesis and antimicrobial activity. **Beilstein of Journal Organic Chemistry**, vol. 11, p. 869–874, 2015.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

XIAO, M.; FAN, X.; CHEN C. A. S.; WANG, H.; SUN, Z.-Y; LIAO, K.; CHEN, S. L.; YAN, Y.; KANG, M.; HU, Z. D.; CHU, Y. Z.; HU, T.-S.; NI, Y.X.; ZOU, G. L.; KONG, F.; XU, Y. C. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. **Jornal Antimicrob Chemother**, vol. 70, p. 802–810, 2014.

YADAV, M. K.; CHAE, S. W.; IM, G. J.; CHUNG, J. W.; SONG, J. J. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Strain Biofilms. **PLoS One**.vol. 10, n. 3, 2015.

YALAZ, M.; AKISU, M.; HILMIOGLU, S.; CALKAVUR, S.; CAKMAK, B.; KULTURSAY, N. Successful caspofungin treatment of multidrug resistant *Candida parapsilosis* septicaemia in an extremely low birth weight neonate. **Mycoses**, vol. 49, n. 3, p. 242–245, 2006.

ZEICHNER, L. O.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H. W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MANGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 47, n. 10, p. 3149–3154, 2003.

ZEIDLER, U.; BOUGNOUX, M. E.; LUPAN, A.; HELYNCK, O.; DOYEN, A.; GARCIA, Z.; SERTOUR, N.; CLAVAUD, C.; LEHMANN, H. M.; SAVEANU, C.; D'ENFERT, C. Synergy of the antibiotic colistin with echinocandin antifungals in *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 68, n. 6, p. 1285-1296, 2013.

ZHOU, Y.; WANG, L.; HAN, L.; MENG, F.; YANG, C. Synthesis, antifungal activities, and potential detoxification of *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)thiocarbamates. **Carbohydrate Research**, vol. 344, n. 11, p. 1289-1296, 2009.

ZUMLA, A.; MEMISH, Z. A.; MAEURER, M.; BATES, M.; MWABA, P.; AL-TAWFIQ, J. A.; DENNING, D. W.; HAYDEN, F. G.; HUI, D. S. Emerging novel and antimicrobial-resistant respiratory tract infections: new drug development and therapeutic options. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 14, n. 11, p. 1136–1149, 2014.