

# Síntese e avaliação do prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopyranosídeo contra espécies não albicans de *Candida* e resultados da associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol

## Synthesis and evaluation of prop-2-yn-1-yl 4,6-di-O-acetyl-2,3-dideoxy- $\alpha$ -D-erythro-hex-2-enopyranoside against non-albicans species of *Candida*, and effectiveness of amphotericin B or ketoconazole combination

Gustavo Lima Soares<sup>1</sup>, Cosme Silva Santos<sup>2</sup>, Juliano Carlo Rufino de Freitas<sup>1,2</sup>, Wyly Araújo de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife, Pernambuco, Brasil

### RESUMO

**OBJETIVOS:** Sintetizar e avaliar a ação antifúngica do prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopyranosídeo contra as espécies não albicans de *Candida*, assim como avaliar sua atividade antimicrobiana quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A síntese desse glicosídeo foi obtida por meio da reação de glicosilação empregando-se o tri-O-acetyl-D-glucal, o álcool 2-propin-1-ol e a montmorillonita K-10. O teste da atividade antifúngica foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, e a associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol, pelo método de Checkerboard. **RESULTADOS:** O glicosídeo foi obtido com 95% de rendimento após o tempo reacional de 1 h e não apresentou atividade antifúngica nas concentrações testadas (512; 0,5  $\mu$ g/mL) quando ensaiado isoladamente. Quando associado com a anfotericina B (concentração inibitória mínima – CIM 2  $\mu$ g/mL) ou com o cetoconazol (CIM 0,5  $\mu$ g/mL), observou-se sinergismo e indiferença, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Verificou-se que o glicosídeo 3 obtido apresentou excelente rendimento na síntese, mas não demonstrou atividade antifúngica ante as cepas não albicans. Quando associado com a anfotericina B, a atividade foi promissora; com o cetoconazol, indiferente.

**Palavras-chave:** *Candida*; Glicosídeo; Combinação de Medicamentos; Antifúngicos.

### ABSTRACT

**OBJECTIVES:** To synthesize and evaluate the antifungal action of prop-2-yn-1-yl 4,6-di-O-acetyl-2,3-dideoxy- $\alpha$ -D-erythro-hex-2-enopyranoside against non-albicans species of *Candida* as well as to evaluate its antimicrobial activity when associated with amphotericin B or with ketoconazole. **MATERIALS AND METHODS:** The synthesis of this glycoside was obtained by the glycosylation reaction using tri-O-acetyl-D-glucal, 2-propyn-1-ol alcohol and montmorillonite K-10. The antifungal activity test was performed by the broth microdilution method and the association with amphotericin B or ketoconazole by the checkerboard method. **RESULTS:** The glycoside was obtained with 95% yield after the reaction time of 1 h and did not present antifungal activity at the tested concentrations (512; 0.5  $\mu$ g/mL) when tested alone. When combined with amphotericin B (minimum inhibitory concentration – MIC 2  $\mu$ g/mL) or ketoconazole (MIC 0.5  $\mu$ g/mL), synergism and indifference were observed respectively. **CONCLUSION:** Glycoside 3 was obtained in excellent yield and did not present antifungal activity against the strains of non-albicans species. But, when associated with amphotericin B, the activity was promising; with ketoconazole, indifferent.

**Keywords:** *Candida*; Glycoside; Combination of Drugs; Antifungals.

### Correspondência / Correspondence:

Willy Araújo de Oliveira

Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde

Sítio Olho D'água da Bica, s/n. CEP: 58175-000 – Cuité, Paraíba, Brasil – Tel.: +55 (83) 3372-1973

E-mail: willyoliveira@gmail.com



<http://revista.iec.gov.br>

Rev Pan-Amaz Saude 2018; 9(2):43-50 – e-ISSN: 2176-6223

## INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* apresenta elevadas taxas de colonização e infecção<sup>1</sup>. Esses micro-organismos são leveduras cosmopolitas encontradas na microbiota normal do homem e de animais, estando presente em diversos sítios do corpo, como mucosas do trato gastrintestinal, boca, vagina e pele<sup>2</sup>; entretanto, tornam-se patogênicas em casos de alterações nos mecanismos de defesa do indivíduo<sup>1</sup>.

As infecções ocasionadas por *Candida* englobam casos de doenças superficiais e invasivas, sobretudo quando ocorre o acometimento de pacientes expostos a diversos fatores de riscos. Infecções de pele, mucosas, candidíase vaginal e candidemias são regularmente relatadas<sup>1</sup>. Em pacientes soropositivos, a candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais habitual<sup>3</sup>.

Durante a evolução da infecção por *Candida*, a levedura atua expressando diversos fatores de virulência, dentre os quais destacam-se a produção de enzimas extracelulares, a síntese de hemolisinas, a capacidade de adesão e a formação de biofilme<sup>4</sup>. Tais fatores são definidos geneticamente, entretanto são expressos pelos micro-organismos quando expostos a determinadas condições<sup>5</sup>. O interesse nesses fatores de virulência justifica-se pela necessidade de se estabelecerem possíveis tratamentos e formas de prevenir a infecção<sup>6</sup>.

A constante utilização de agentes antifúngicos tem despertado preocupações devido à seleção de cepas resistentes. Estudos têm relatado alta incidência de infecções ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* resistentes aos fármacos de primeira e segunda escolha, como é o caso dos derivados azólicos, que estão entre os mais prescritos para o tratamento de candidíase<sup>7,8</sup>.

O tratamento de patógenos recorrentes é uma problemática em ascensão nos dias atuais e fundamenta-se em duas alternativas: a descoberta de novos fármacos antimicrobianos e/ou a associação de substâncias já existentes<sup>9</sup>. A associação de antimicrobianos é uma alternativa em infecções de etiologia polimicrobiana, onde a obtenção da cura pela monoterapia é dificultada<sup>10</sup>.

A investigação de novas moléculas, com potencial de serem ativas biologicamente, desponta como uma importante alternativa terapêutica, possibilitando explorar novos alvos terapêuticos e propor novas estratégias de agir sobre alvos terapêuticos já determinados<sup>11</sup>. Uma grande quantidade de moléculas ativas vem sendo obtida pela síntese orgânica<sup>12</sup>, como é o caso dos glicosídeos<sup>13,14,15</sup>.

Os glicosídeos são produtos obtidos por meio da reação de glicosilação, constituídos basicamente por duas unidades, a unidade sacarídica e a unidade ligada pelo carbono anomérico, denominada glicona (grupo sacarídico) ou aglicona (grupo não sacarídico).

Os objetivos deste estudo foram sintetizar e avaliar a ação antifúngica do prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranósideo

contra espécies não albicans de *Candida*, assim como avaliar sua atividade antimicrobiana quando associado à anfotericina B ou ao cetoconazol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### PROCEDIMENTO GERAL: EQUIPAMENTOS E ANÁLISE DOS DADOS

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em um espetrômetro VARIAN® modelo Unity Plus-300, utilizando como solvente o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Esse espetrômetro foi calibrado usando tetrametilsilano (0,00 ppm) como referência interna para os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e todas as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram descritas em hertz (Hz). O espectro de infravermelho foi registrado em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier no Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer, modelo PerkinElmer, sendo a amostra preparada como pastilhas de KBr. A rotação específica foi determinada em um polarímetro digital da marca JASCO® P-2000 equipado com a luz de sódio em comprimento de onda 589 nm. A amostra foi preparada em concentração de 1 m/v % (em MeOH) em uma cubeta de 1 mL. O ponto de fusão foi realizado no Electrothermal série IA9100 Digital Melting Point. A chapa de agitação com aquecimento e a manta aquecedora eram da marca Fisatom, modelo 754A e 102E, respectivamente. O solvente foi removido, utilizando um evaporador rotativo da BÜCHI Rotavapor®, modelo R-114, conectado a uma bomba de vácuo modelo KNF Neuberger, e o solvente remanescente foi removido, utilizando uma bomba de alto vácuo da Edwards, modelo RV3. As estruturas dos compostos foram geradas por meio do software ChemBioUltra® v12.0.

### PROCEDIMENTO DE SÍNTESE DO prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranósideo (GLICOSÍDEO 3)

O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada, utilizando placas de sílica-gel contendo indicador fluorescente  $\text{F}_{254}$  da Merck. Para visualização, as placas foram colocadas em solução ácida ( $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95:5) e solução de vanilina. A purificação, por meio da cromatografia líquida em coluna, foi realizada com o uso de sílica-gel 60 (Merck, 70-230 mesh), como fase estacionária, e sistemas hexano:acetato de etila, como fase móvel, numa coluna de vidro em diferentes proporções. Os solventes comerciais foram purificados de acordo com os protocolos descritos na literatura<sup>16</sup>. O hexano e o acetato de etila foram destilados em coluna de Vigreux, o diclorometano, sob hidreto de cálcio, e o metanol, sob magnésio metálico e iodo sublimado. Os reagentes tri-O-acetil-D-glucal e o álcool 2-propin-1-ol da Sigma-Aldrich.

A síntese do composto prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranósideo foi realizada segundo o protocolo de Toshima et al.<sup>17</sup>, com algumas modificações. Desse modo, em um balão de fundo redondo, com capacidade de 50 mL,

foram adicionados o tri-O-acetyl-D-glucal (1; 0,27 g; 1 mmol), o álcool 2-propin-1-ol (2; 69,7  $\mu$ L; 67,2 mg; 1,2 mmol) e o diclorometano seco (20 mL). Em seguida, o balão foi resfriado a 0 °C e mantido sob agitação por 5 min. Após esse intervalo de tempo, foi adicionado montmorillonita K-10 (0,16 g; 60% M/M), e um sistema de refluxo foi acoplado ao balão. A mistura reacional foi mantida sob agitação e aquecimento ( $50 \pm 5$  °C) por 1 h. Logo depois, o aquecimento foi interrompido, e o término da reação, verificado por cromatografia de camada delgada. Dando prosseguimento, a solução contida no balão foi filtrada e o solvente, removido sob pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando sílica-gel como fase estacionária e o sistema hexano:acetato de etila (início de 100:0 até 90:10) como fase móvel.

#### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Foram utilizadas quatro cepas fúngicas: *Candida tropicalis* ATCC-13803, *Candida parapsilosis* ATCC-20019, *Candida krusei* LM-13 e *Candida guilliermondii* LM-703.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo, utilizando como meio o caldo Sabouraud dextrose<sup>2,18,19</sup>. A concentração inicial do prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranósideo testada foi de 512  $\mu$ g/mL e diluída seriadamente 1:2 até a concentração final de 0,5  $\mu$ g/mL. As concentrações iniciais da anfotericina B e do cetoconazol foram de 128  $\mu$ g/mL e diluídas seriadamente 1:2 até a concentração final de 0,0078  $\mu$ g/mL. O inóculo foi adicionado em uma concentração final de aproximadamente 1-5  $\times$  10<sup>5</sup> UFC/mL em cada cavidade. As soluções foram preparadas com o auxílio de DMSO (dimetilsulfóxido). Foram utilizados controles com DMSO nas mesmas concentrações usadas no teste.

Utilizou-se inóculo fúngico, contendo aproximadamente 1-5  $\times$  10<sup>6</sup> UFC/mL, padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A incubação dos ensaios ocorreu em estufa a aproximadamente 35 °C, durante 48 h. Como

CIM, considerou-se a menor concentração da substância testada, capaz de produzir inibição visual do crescimento das cepas de levedura utilizadas nos ensaios microbiológicos<sup>20</sup>; fato confirmado pela adição de 20  $\mu$ L de TTC 1% (2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio) em cada cavidade<sup>2</sup>.

#### ASSOCIAÇÃO DAS DROGAS

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

Realizou-se o estudo das associações pela técnica Checkerboard para a determinação do índice da concentração inibitória fracionária (ICIF), utilizando placas estéreis de microdiluição com 96 cavidades. Distribuíram-se as soluções na placa, de forma que todas as concentrações da substância A (glicosídeo), na horizontal, combinasse com todas as concentrações da substância B (anfotericina B ou cetoconazol) na vertical.

O experimento foi conduzido com inóculo 1-5  $\times$  10<sup>5</sup> UFC/mL em cada cavidade. Para a realização das associações, utilizou-se a cepa fúngica *C. tropicalis* ATCC-13803.

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

Calculou-se o ICIF pela seguinte equação: ICIF = CIF<sup>A</sup> + CIF<sup>B</sup>, onde a concentração inibitória fracionária<sup>A</sup> (CIF<sup>A</sup>) foi calculada pela relação CIM<sup>A</sup> combinado/CIM<sup>A</sup> sozinho; enquanto que o CIF<sup>B</sup> = CIM<sup>B</sup> combinado/CIM<sup>B</sup> sozinho<sup>21</sup>. Sendo A o glicosídeo e B a anfotericina B ou o cetoconazol.

O ICIF foi classificado da seguinte forma: sinergismo ( $\leq 0,5$ ), indiferença ( $> 0,5 < 4$ ), antagonismo ( $\geq 4$ )<sup>22,23</sup>.

#### RESULTADOS

O prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranósideo (glicosídeo 3) foi obtido na forma de um sólido branco amorfó, com excelente rendimento (Figura 1).

Os resultados da análise espectroscópica dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e infravermelho estão descritos na tabela 1.

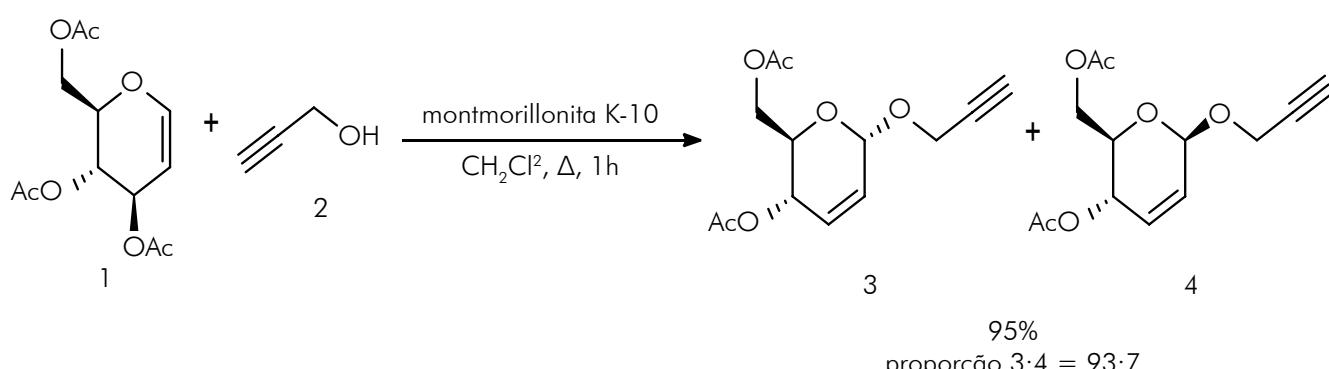


Figura 1 – Síntese dos O-glicosídeos 2,3-insaturados 3 e 4

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do glicosídeo 3 apresentou 13 sinais quimicamente diferentes (Tabela 1), valor esse semelhante à quantidade de carbonos presentes na estrutura do glicosídeo 3.

Na figura 2, observa-se a ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) da reação de glicosilação para determinar a proporção dos glicosídeos 3 e 4.

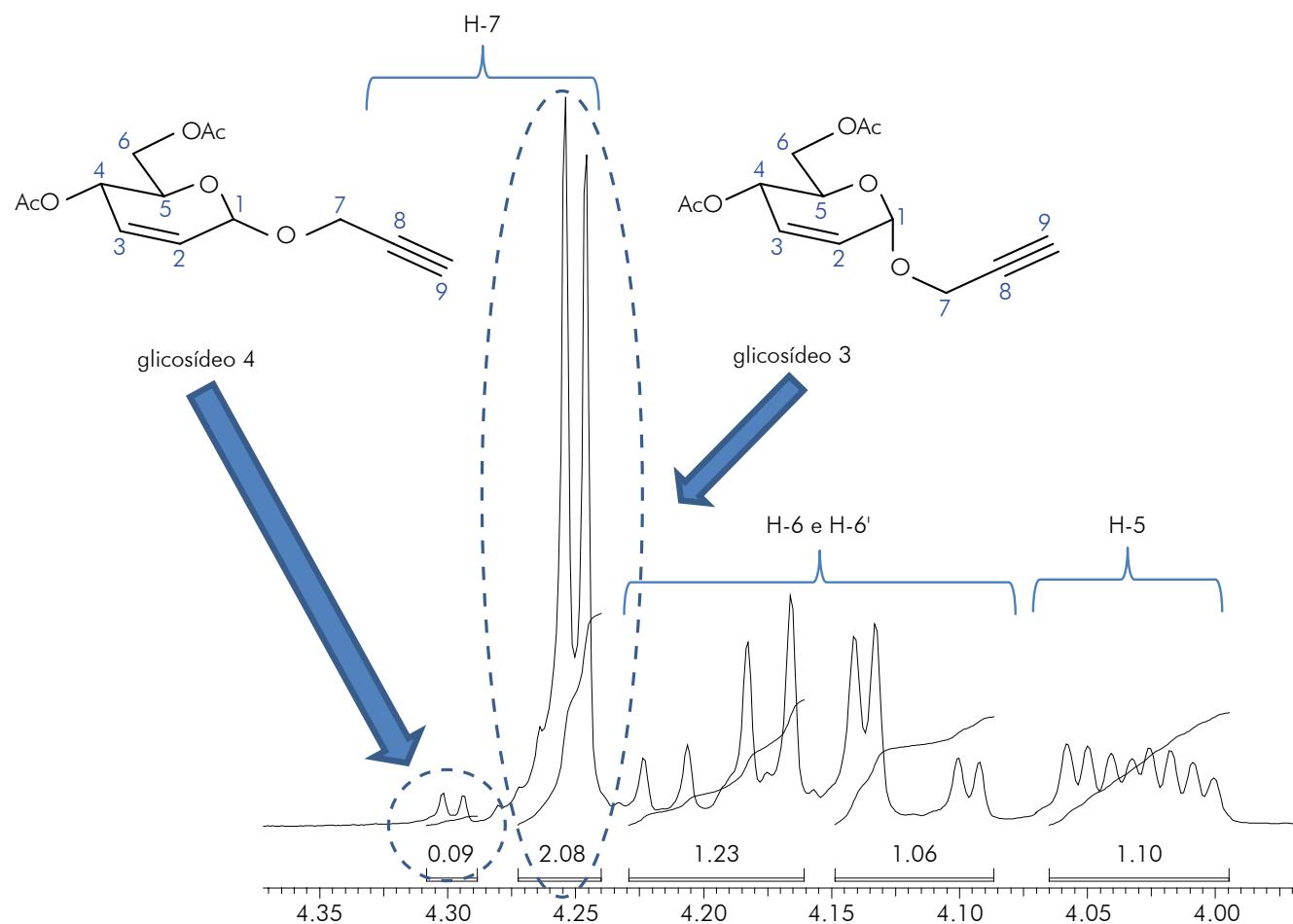
A técnica espectroscópica NOESY corroborou a constatação do produto majoritário da reação de glicosilação (Figura 3).

O glicosídeo 3 usado nos ensaios não apresentou atividade antifúngica em qualquer das cepas utilizadas nas concentrações testadas. Os valores das CIM da anfotericina B e do cetoconazol estão descritas na tabela 2.

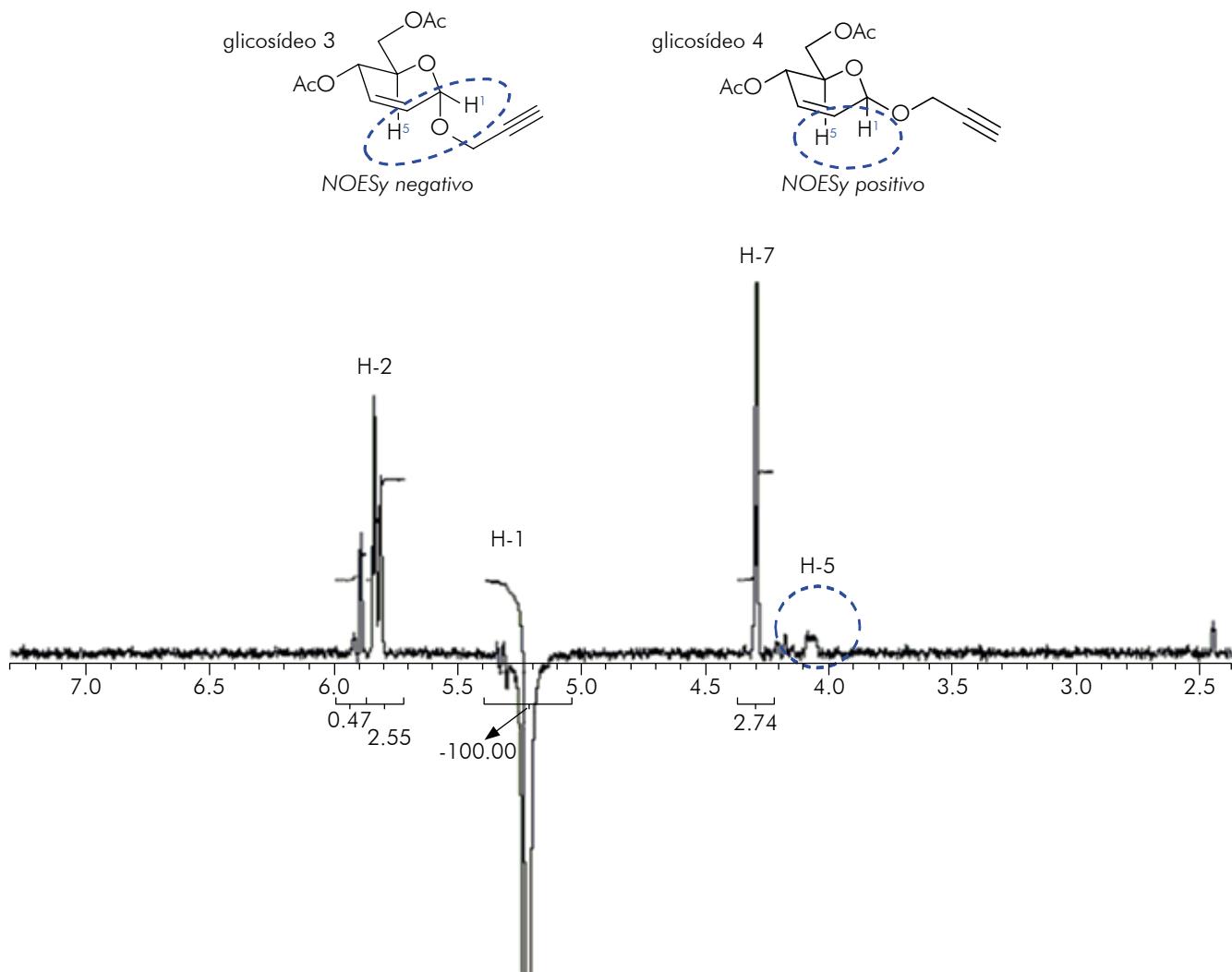
**Tabela 1** – Análise espectroscópica dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e infravermelho do glicosídeo 3

Estrutura do composto	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) ppm	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) ppm	Infravermelho (pastilha KBr) $\text{cm}^{-1}$
	5,90 (dl, $J = 10,2$ Hz, H-3) 5,82 (dt, $J = 10,2$ e 1,5 Hz, H-2) 5,33 (ddd, $J = 9,6, 3,0$ e 1,5 Hz, H-4) 5,22 (sl, H-1) 4,29 (d, $J = 2,4$ Hz, H-7) 4,25 (dd, $J = 12,4$ e 5,4 Hz, H-6) 4,16 (dd, $J = 12,4$ e 2,4 Hz, H-6) 4,07 (ddd, $J = 9,6; 5,4$ e 2,4 Hz, H-5) 2,07 (t, $J = 2,4$ Hz, H-9) 2,09 (s, OAc) 2,07 (s, OAc)	170,7 (C=O) 170,2 (C=O) 129,7 (C-3) 127,1 (C-2) 92,7 (C-1) 78,9 (C-8) 74,8 (C-9) 67,1 (C-5) 65,0 (C-4) 62,7 (C-6) 55,0 (C-7) 20,9 (CH <sub>3</sub> ) 20,7 (CH <sub>3</sub> )	3296 (vCsp-H) 3058 (vCsp <sup>2</sup> -H) 2918 (vCsp <sup>3</sup> -H) 2129 (vC=C) 1741 (vC=O) 1373 ( $\delta\text{CH}_3$ ) 1235 ( $\delta\text{O}-\text{CO}-\text{C}$ ) 1038 ( $\delta\text{C}-\text{O}$ )

RMN: Ressonância magnética nuclear; ppm: Parte por milhão; dl: Duplo largo; dt: Duplo tripla; ddd: Duplo duplo de duplo; sl: Simpleto largo; d: Duplo; t: Tripla; s: Simpleto; v: Deformação axial;  $\delta$ : Deformação angular.



**Figura 2** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) da reação de glicosilação para determinar a proporção dos glicosídeos 3 e 4



**Figura 3** – Espectro de NOESY-1D (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do glicosídeo 3 – irradiação no hidrogênio H-1 (5,22 ppm)

**Tabela 2** – Valores das CIM do glicosídeo 3, da anfotericina B e do cetoconazol frente às cepas não albicans

Espécie fúngica	CIM glicosídeo 3	CIM anfotericina B	CIM cetoconazol
<i>C. krusei</i> LM-13	+	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>C. parapsilosis</i> ATCC-20019	+	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>C. guilliermondii</i> LM-703	+	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$

CIM: Concentração inibitória mínima; +: Crescimento fúngico em todas as concentrações testadas.

Para a realização das associações, foi considerada, como CIM do glicosídeo 3, a maior concentração testada. A associação entre o glicosídeo 3 e a

anfotericina B apresentou resultado muito satisfatório e promissor; enquanto que, entre o glicosídeo 3 e o cetoconazol, o resultado não foi o esperado (Tabela 3).

**Tabela 3** – Associação entre o glicosídeo 3 e a anfotericina B ou o cetoconazol contra *C. tropicalis* ATCC-13803

CIF anfotericina B	0,125	CIF cetoconazol	0,5
CIF glicosídeo 3	0,125	CIF glicosídeo 3	0,125
ICIF	0,25	ICIF	0,625
Interação	Sinergismo	Interação	Indiferença

CIF: Concentração inibitória fracionária; ICIF: Índice da concentração inibitória fracionária.

## DISCUSSÃO

A análise dos dados espectroscópicos, provenientes dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de NOESY, demonstrou que o glicosídeo, obtido como produto majoritário da reação de glicosilação, foi o composto 3. As informações detalhadas na tabela 1 corroboraram a estrutura do glicosídeo 3. Por fim, o ângulo de desvio óptico da solução metanólica do glicosídeo 3 foi positivo.

Após algumas mudanças no protocolo experimental descrito por Toshima et al.<sup>17</sup>, os glicosídeos 3 e 4 foram obtidos com 95% de rendimento e com uma diastereosseletividade de 95:5, que foi um pouco superior ao relatado por aqueles autores, tendo sido determinada pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ , utilizando a razão entre as integrais do sinal do hidrogênio metilênico (numerado como H-7) de ambos os compostos. O hidrogênio H-7 foi escolhido porque os demais sinais estavam sobrepostos (por exemplo, H-6, H-6' e H-5) (Figura 2).

Por meio da técnica espectroscópica NOESY, que leva em consideração as proximidades dos núcleos de  $^1\text{H}$  no espaço<sup>24</sup>, foi observado que o produto majoritário foi o glicosídeo 3, uma vez que a irradiação seletiva no hidrogênio H-1 (5,22 ppm) não afetou consideravelmente o hidrogênio H-5 (4,07 ppm), apenas os hidrogênios H-7 (4,29 ppm) e H-2 (5,82 ppm) (Figura 3).

Com relação ao espectro de infravermelho do glicosídeo 3, foram observadas várias bandas de absorção; no entanto, as bandas em número de ondas de 3296, 3058, 2918, 2129, 1741, 1373, 1235 e 1038  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas às ligações Csp-H (deformação axial, moderada), Csp<sup>2</sup>-H (deformação axial, fraca), Csp<sup>3</sup>-H (deformação axial assimétrica, fraca), C≡C (deformação axial, fraca), C=O (deformação axial, forte), CH<sub>3</sub> (deformação angular, moderada), O-CO-C (deformação angular, moderada) e C-O (deformação angular, forte), respectivamente.

O ponto de fusão e o ângulo de desvio óptico da solução metanólica do glicosídeo 3 foram de 58 a 59 °C e  $[\alpha]_D^{20} +137,7$ , valores esses próximos ao descrito na literatura (59 °C)<sup>25</sup>.

A terapia combinada de antifúngicos é considerada uma alternativa terapêutica importante para o tratamento de infecções, possibilitando benefícios como: redução da toxicidade, devido ao uso de menores concentrações de cada substância ativa; tratamento das infecções por múltiplos patógenos; e/ou prevenção ou retardar o desenvolvimento *in vivo* de subpopulações resistentes a antimicrobianos<sup>26,27,28</sup>. Nesse contexto, na combinação de fármacos, o sinergismo é a interação mais desejada<sup>27,29</sup>.

Estudos relatam que o efeito antimicrobiano dos fármacos tem sido potencializado tanto em micro-organismos sensíveis quanto em cepas resistentes a cada um dos fármacos, nos casos de associações sinérgicas<sup>10,30</sup>.

Para que se estabeleça a terapia combinada adequada entre antimicrobianos, é fundamental que se compreenda a interação existente na combinação dos fármacos. A metodologia do Checkerboard é uma das mais utilizadas para verificar o comportamento da associação *in vitro* no crescimento microbiano<sup>27</sup>.

Segundo Liu et al.<sup>31</sup>, existem limitações nas combinações de antifúngicos, como alto custo, efeitos indesejáveis e resultados contraditórios de ações sinérgicas ou antagônicas de algumas combinações de antifúngicos. Dessa forma, estudos com foco em avaliar combinações de antifúngicos com não antifúngicos vem sendo desenvolvidos.

A combinação de antifúngicos com agentes não antifúngicos, a exemplo da combinação com antibacterianos, sobretudo em infecções fúngicas profundas, apresenta-se como uma importante alternativa terapêutica. Outros agentes não antifúngicos, como os inibidores da calcineurina, inibidores da proteína 90 de choque térmico, reguladores da homeostase do cálcio e anti-inflamatórios não esteroidais, têm sido combinados com fluconazol, observando-se resultados sinérgicos. Outro fato importante é que combinações *in vitro* do ibuprofeno com o fluconazol contra estirpes resistentes ao fluconazol apresentam sinergia; porém essa mesma ação não é observada em estirpes sensíveis ao fluconazol<sup>31</sup>.

Foi observado sinergismo entre a associação de concentrações subinibitórias de estatinas com antifúngicos da classe dos azóis contra as espécies não albicans. A fluocitosina é um exemplo de antifúngico de pouca utilização clínica isoladamente, devido ao seu limitado espectro de ação e toxicidade considerável<sup>32,33</sup>. Entretanto, é comumente utilizada em combinação com a anfotericina B<sup>34</sup>. Estudos da associação entre a anfotericina B e a fluocitosina têm demonstrado sinergia contra cepas resistentes de *Candida* spp.<sup>35</sup>.

Os resultados da associação do glicosídeo com a anfotericina B foram diferentes da associação com o cetoconazol, possivelmente devido às diferenças entre os mecanismos de ação dos poliénicos e dos azóis.

## CONCLUSÃO

O glicosídeo 3 obtido apresentou excelente rendimento e sua estrutura foi confirmada por diferentes técnicas espectroscópicas; no entanto, não apresentou atividade antifúngica ante as cepas não albicans de *Candida* quando utilizado isoladamente. Quando associado com a anfotericina B, a atividade foi sinérgica; com o cetaconazol, indiferente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Campina Grande e a Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

## APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve conflitos de interesse.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram com a idealização do estudo, a análise e a interpretação dos dados e com a redação do manuscrito, aprovando a versão final publicada. Declaram-se responsáveis pelo conteúdo integral do artigo, garantindo sua precisão e integridade.



## REFERÊNCIAS

- 1 Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Medical mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 195-239.
- 2 Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. *Rev Bras Plantas Med.* 2011;13(2):203-8.
- 3 Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 mai-jun;40(3):272-6.
- 4 Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 2010 jun;46(3):225-34.
- 5 Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 jan-fev;40(1):91-3.
- 6 Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JAMS, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung KWS, et al. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol.* 2005 Jun;54(Pt 6):583-93.
- 7 Sahu JK, Ganguly S, Kaushik A. Triazoles: a valuable insight into recent developments and biological activities. *Chin J Nat Med.* 2013 Sep;11(5):456-65.
- 8 Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol.* 2014 Mar;11:65-71.
- 9 Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Gismondo MR. *In vitro* evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. *BMC Infect Dis.* 2007 Sep;7:111.
- 10 Mitsugui CS, Tognim MCB, Carrara-Marrone FE, Garcia LB. Efeito antimicrobiano *in vitro* da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Cienc Cuid Saude.* 2008;7(supl 1):76-81.
- 11 Fuentefria AM, Andrade SF, Silveira GP, Kulkamp I, Pippi B, Machado MM, et al. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate a candidemias. *J Infect Control.* 2016;5(1):1-13.
- 12 Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn.* 2006 abr-jun;16(2):197-201.
- 13 Baker P, Hill PJ, Snarr BD, Alnabelseya N, Pestarak MJ, Lee MJ, et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci Adv.* 2016 May;2(5):e1501632.
- 14 Chen Y, Ni W, Yan H, Qin XJ, Khan A, Liu H, et al. Spirostanol glycosides with hemostatic and antimicrobial activities from *Trillium kamtschaticum*. *Phytochemistry.* 2016 Nov;131:165-73.
- 15 Eissa AM, Abdulkarim A, Sharples GJ, Cameron NR. Glycosylated nanoparticles as efficient antimicrobial delivery agents. *Biomacromolecules.* 2016;17(8):2672-9.
- 16 Armarego WLF, Perrin DD. *Purification of laboratory chemicals*. Oxford: Butterworth Heinemann; 1996.
- 17 Toshima K, Ishizuka T, Matsuo G, Nakata M. Practical glycosidation method of glycols using montmorillonite K-10 as an environmentally acceptable and inexpensive industrial catalyst. *Synlett.* 1995;1995(4):306-8.
- 18 Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. *Rev Odontol UNESP.* 2010 mai-jun;39(3):179-84.
- 19 Cortez LER, Yamaguchi MU, Cortez DAG, Pesco DCS. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E.

- Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae). *Mundo Saude*. 2015 out-dez;39(4):433-40.
- 20 Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 21 Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparasion of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Feb;49(2):345-51.
- 22 Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008 Aug;15(8):639-52.
- 23 Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DL, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 2011 Dec;19(1):42-7.
- 24 Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introdução à espectroscopia*. São Paulo: Cengage Learning; 2010.
- 25 De K, Legros J, Crousse B, Bonnet-Delpont D. Synthesis of 2,3-unsaturated glycosides via metal-free Ferrier reaction. *Tetrahedron*. 2008 Nov;64(46):10497-500.
- 26 Macedo L, Fernandes T, Silveira L, Mesquita A, Franchitti AA, Ximenes EA.  $\beta$ -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Phytomedicine*. 2013 Dec;21(1):25-9.
- 27 Menezes TGC. Avaliação *in vitro* da atividade anti-MRSA de vancomicina encapsulada em lipossomas e do sinergismo com ácido úsnico e  $\beta$ -lapachona [dissertação]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2014. 68 p.
- 28 Nogueira LG. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori* [tese]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2012. 107 p.
- 29 Segatore B, Bellio P, Setacci D, Brisdelli F, Piovano M, Garbarino JA, et al. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillinresistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and  $\Delta E$  model methods. *Phytomedicine*. 2012 Feb;19(3-4):341-7.
- 30 Barbosa DBM. Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus* [tese]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2011. 93 p.
- 31 Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 May;43(5):395-402.
- 32 Cabral ME, Figueroa LIC, Fariña JI. Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. *Rev Iberoam Micol*. 2013 Jan;30(1):31-8.
- 33 Wilson DT, Drew RH, Perfect JR. Antifungal therapy for invasive fungal diseases in allogeneic stem cell transplant recipients: an update. *Mycopathologia*. 2009 Dec;168(6):313-27.
- 34 Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- 35 Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):693-715.

Recebido em / Received: 13/4/2017

Aceito em / Accepted: 21/9/2017

Como citar este artigo / How to cite this article:

Soares GL, Santos CS, Freitas JCR, Oliveira WA. Síntese e avaliação do prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranósideo contra espécies não albicans de *Candida* e resultados da associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2018 abr-jun;9(2):43-50. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232018000200006>