

Centro Universitário de Patos - UNIFIP
 Curso de Medicina
 v. 5, n. 2, abr/jun 2020, p. 48-58.
 ISSN: 2448-1394



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN CONTRA ESPÉCIES DE CANDIDA

EVALUATION OF MORITA-BAYLIS-HILLMAN ADDUCTS FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST CANDIDA SPECIES

Brenda Lavínia Calixto dos Santos Guedes
 Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte - Brasil
bcalixto96@gmail.com

Gustavo Lima Soares
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba - Brasil
guga.limasr@gmail.com

Brenna Ravena Araújo
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba – Brasil
b.ravena@hotmail.com

Kristerson Reinaldo de Luna Freire
 Universidade Federal da Paraíba– UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
kristerson@gmail.com

Fernando da Silva Moraes
 Universidade Federal da Paraíba– UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
souriscanada@gmail.com

Wylly Araújo de Oliveira
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba - Brasil
wyllyoliveira@gmail.com

RESUMO

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica da associação do Aduto de Morita-Baylis-Hillman com drogas sintéticas sobre espécies de *Candida*.

Métodos: Os ensaios para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados através da técnica de microdiluição e os ensaios da associação foram realizados pela técnica de *checkerboard*.

Resultados: Os adutos de Morita-Baylis-Hillman apresentaram atividade antifúngica frente cepas de *Candida albicans* e ausência de atividade contra cepas de *Candida* não-*albicans*.

Conclusões: A associação do aduto de Morita-Baylis-Hillman com o antifúngico sintético caspofungina mostrou-se sinérgica enquanto a associação com a anfotericina B foi indiferente. O sinergismo é importante devido a busca de novas substâncias que venham incrementar as opções de farmacoterapia, ampliando o espectro de ação de antibióticos.

Palavras-Chave: *Candida*; Adutos de Morita-Baylis-Hillman; Antifúngicos sintéticos.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of the association of Morita-Baylis-Hillman adduct with synthetic drugs on *Candida* species.

Methods: Assays to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were performed using the microdilution technique and association assays were performed by the *checkerboard* technique.

Results: Morita-Baylis-Hillman adducts showed antifungal activity against *Candida albicans* strains and no activity against non-*albicans* *Candida* strains.

Conclusions: The association of Morita-Baylis-Hillman adduct with the synthetic antifungal caspofungin was synergistic while the association with amphotericin B was indifferent. Synergism is important due to the search for new substances that will increase pharmacotherapy options, broadening the spectrum of action of antibiotics.

Keywords: *Candida*; Morita-Baylis-Hillman Adducts; Synthetic Antifungals.

1. Introdução

Candida spp são patógenos comensais e oportunistas na presença de fatores predispostos comumente encontrados na microbiota normal, colonizando vagina, boca e trato gastrointestinal¹⁻³. Infecções causadas por espécies desse gênero vem crescendo rapidamente nos últimos anos, sendo a candidíase uma das micoses oportunistas mais comuns em todo o mundo, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos e caracterizada pela dificuldade de diagnóstico e tratamento⁴⁻⁶.

Dentre as infecções causadas por este gênero, a candidíase oral é uma infecção com alta incidência e prevalência em diferentes populações em todo o mundo⁷. As infecções do trato urinário são comumente causadas por *Candida albicans*, embora a frequência de espécies de *Candida* não-*albicans*, exemplo *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, que causam essas infecções venha aumentando⁵. Essas espécies também são capazes de causar infecções intestinais, de pele e candidemia⁸.

Os fungos apresentam mecanismos que evitam a sua identificação pelo sistema de defesa do hospedeiro e possibilitam o surgimento da infecção, são eles os fatores de virulência. Esses fatores são determinados geneticamente, porém expressos quando em determinadas condições. Dentre os fatores de virulência de *Candida* podemos citar a produção de enzimas extracelulares como fosfolipases e proteinases, atividade hemolítica, capacidade de adesão, variabilidade genotípica, switching fenotípico, formação de biofilme e polimorfismo que contribuem para sua patogenicidade^{1,9-11}.

O número de fungos resistentes à terapia fornecida vêm crescendo significativamente, assim como as infecções causadas por estes. Dessa maneira, as espécies de *Candida*, vem apresentando resistência a antifúngicos como anfotericina B, anidulafungina, fluconazol e itraconazol¹².

Nos últimos anos, tem havido um grande esforço na descoberta de novos agentes eficazes para combater infecções fúngicas e com baixa toxicidade. Neste sentido, pode-se destacar estudos com uso de substâncias sintéticas com atividade biológica obtidas

através da reação de Morita-Baylis-Hillman, tendo como produto adutos polifuncionalizados de grande interesse sintético¹³⁻⁴. Adendo a isso, o alto rendimento reacional é uma característica inerente a essas reações, pois é uma transformação química com elevada economia de átomos¹⁵⁻⁶.

Adutos de Morita-Baylis-Hillman são moléculas formadas através da condensação de aldeídos ou cetonas na posição alfa de uma olefina contendo um grupo retirador de elétrons, catalisada por uma amina terciária ou fosfina¹⁷. Vários autores vêm utilizando esses adutos para a síntese de moléculas biologicamente ativas e, além disso, os próprios e/ou derivados vêm apresentando atividades biológicas importantes, como antifúngica, bactericida, antiparasitária, entre outras¹⁸.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de um aduto de Morita-Baylis-Hillman e do seu derivado acetilado sozinhos, e em combinação com a caspofungina e com a anfotericina B contra espécies de *Candida*.

2. Métodos

Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

Inicialmente, foi realizada a síntese de 2-((2-cloroquinolina-3-il)(hidróxi)metil)acrilato de metila (aduto A), através da mistura do 2-cloroquinolina-3-carboxaldeído (1,0 equiv., 3,6 mmol, 0,70g), DABCO (1,0 equiv., 3,6 mmol, 0,403g) e acrilato de metila (20,0 equiv., 70 mmol), ficou sob agitação magnética sendo monitorada por CCDA até parar a evolução da reação (48 horas) e em seguida evaporou-se o acrilato de metila em um rotaevaporador. Diluiu-se a mistura reacional em AcOEt e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (3x de 25mL). Secou-se sob Na₂SO₄ anidro e evaporou-se o solvente. O bruto reacional foi purificado em coluna cromatográfica de sílica utilizando como eluente o sistema de eluição hexano/AcOEt (90/10). obtendo-se 0,56g do aduto, na forma de um pó amarelo claro, correspondendo a um rendimento de 80%¹⁹. IV (KBr, ν_{\max}): 3537, 3216, 3062, 2992, 2955, 1702, 1619, 1490, 1331, 1138, 1033, 759, 708, 595 cm⁻¹. ¹H RMN (250 MHz, CDCl₃): δ 3,8 (s, 3H); 5,65 (s, 1H); 6,1 (s, 1H); 6,40 (s, 1H); 7,5 (t, 1H); 7,75 (t, 1H); 7,8 (d, 1H), 8,0 (d, 1H); 8,4 (s, 1H). ¹³C RMN (62,5 MHz, CDCl₃): δ 167,06; 149,49; 147,33; 140,42; 137,29; 132,89; 130,81; 128,37; 128,05; 127,97; 127,46; 127,40; 69,45; 52,51.

Posteriormente foi realizada a síntese de 2-(acetóxi(2-cloroquinolin-3-il)metil)acrilato de metila (aduto B), foi utilizada a solução do aduto sintetizado anteriormente (1,0 equiv., 1,08 mmol, 0,3 g) em 5 mL CH₂Cl₂, foram adicionados piridina (2,3 equiv., 2,48 mmol), quantidade catalítica de DMAP e anidrido acético (4,9 equiv., 5,29 mmol), à -7°C. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura

ambiente, até o consumo do material de partida (24 horas) e em seguida foram evaporados a piridina e o diclorometano em um rotaevaporador. Na etapa de extração, diluiu-se a mistura reacional em acetato de etila (AcOEt) e lavou-se a fase orgânica com solução de ácido acético à 10% (2x de 20mL) e solução de bicarbonato de sódio (2x de 20mL). Secou-se sob Na₂SO₄ anidro e evaporou-se o solvente. O bruto reacional foi purificado em coluna cromatográfica de sílica utilizando sistema de eluição hexano/AcOEt (90/10), obtendo-se 0,249g de produto, na forma de um sólido amarelo, correspondendo a um rendimento de 83%²⁰. IV (KBr, ν_{\max}): 3079, 2949, 1726, 1623, 1435, 1299, 1246, 1153, 1053, 955, 750, 597 cm⁻¹. ¹H RMN (200MHz, CDCl₃): δ 2,31 (s, 3H); 3,89 (s, 3H); 5,96 (m, 1H); 6,72 (m,1H); 7,72 (m, 1H); 7,89 (ddd, 1H, J= 1,44; 6,96 e 8,46Hz); 7,97 (m, 1H); 8,17 (m, 1H); 8,28 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 20,9; 52,4; 70,1; 126,9; 127,5; 127,8; 128,4; 128,6; 129,9; 131,1; 137,6; 37,7; 147,4; 149,9; 165,1; 169,2.

Atividade antimicrobiana

Analisou-se a atividade antifúngica dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman A e B, e dos antifúngicos caspofungina e anfotericina B. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada tendo como base o método de microdiluição em caldo Sabouraud²¹⁻².

A concentração do inóculo fúngico foi ajustada de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala McFarland, com aproximadamente 1 - 5 x 10⁶ UFC/mL. O experimento foi realizado em microplacas estéreis contendo 96 cavidades, nas quais foram testadas concentrações dos adutos de Morita-Baylis-Hillman entre 1024 e 16 μ g/mL diluídos seriadamente de 1:2, o experimento foi conduzido com 1 - 5 x 10⁵ UFC/mL em cada cavidade, onde foram adicionados o micro-organismo, o caldo Sabouraud e o composto sintético ou antifúngico. Para solubilizar as substâncias foram utilizados água, tween e DMSO. Em cada placa foram incluídos controles com tween e DMSO na mesma concentração utilizada na preparação das drogas a serem testadas, e o experimento foi realizado em triplicata.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por 48 h com monitoramento diário. Foi considerada como CIM a menor concentração do composto sintético ou dos antifúngicos capaz de inibir o crescimento da levedura. As cepas utilizadas foram: *Candida albicans* LM - 178, *Candida albicans* ATCC - 76485, *Candida albicans* LM - 703, *Candida albicans* ICB 12, *Candida albicans* ATCC - 76645, *Candida guilliermondii* LM-103, *Candida tropicalis* 10, *Candida tropicalis* ATCC - 13803, *Candida parapsilosis* ATT - 20019, *Candida krusei* 120.

O ensaio de associação do aduto de Morita-Baylis-Hillman (aduto A) com anfotericina B ou caspofungina foi realizado através do método de *Checkerboard* com a

cepa *Candida albicans* ATCC-76645. Foram associadas várias concentrações do aduto A (CIM x 8, CIM x 4, CIM x 2, CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8) com diferentes concentrações de anfotericina B ou caspofungina (CIM x 8, CIM x 4, CIM x 2, CIM, CIM /2, CIM/4, CIM/8). Os testes foram realizados em triplicata. As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por 48 h com monitoramento diário^{21,23}.

Já o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) foi calculada através da seguinte fórmula²⁴:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B$$

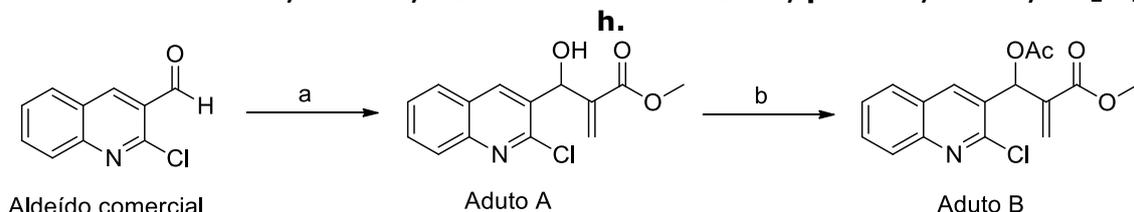
Onde, $CIF_A = CIM_A$ combinado/ CIM_A sozinho e $CIF_B = CIM_B$ combinada/ CIM_B sozinho. Foi considerado sinérgico ICIF menor que 0.5, aditivo ICIF entre 0.5 e 1, indiferente ICIF entre 1 e 4 e atividade antagônica com ICIF maior que 4.

3. Resultados

As reações de síntese para obtenção dos dois adutos utilizados nesse estudo foram feitas em meio reacional brando, sem necessitar de aquecimento ou sistema de refluxo, e foram obtidos rendimentos acima de 80%. Na síntese do 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metilo a reação completou-se com 24h e obtendo-se rendimento de 80%, já na síntese do 2 - (acetóxi (2-cloroquinolin-3-il) metil) acrilato de metilo a reação completou-se com 48h e tendo rendimento final de 83%.

Estudos acerca de síntese de compostos quinolínicos, como os apresentados no Esquema 1 abaixo, e sua atividade antifúngica tem se mostrado muito importante, pois, de acordo com Ben Yaakov et al.²⁵, há uma crescente urgência quanto ao desenvolvimento de novos antifúngicos.

Esquema 1 – Obtenção dos adutos de Morita-Baylis-Hillman estudados. a. Acrilato de metila, DABCO, 48h. b. Anidrido acético, piridina, DMAP, CH₂Cl₂, 48



Fonte:Pesquisadores (2019).

Na tabela 1, pode-se observar o resultado das CIMs dos adutos de Morita-Baylis-Hillman 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metila (aduto A) e 2 - (acetoxi (2-cloroquinolin-3-il) metil) acrilato de metila (aduto B) frente às cepas fúngicas,

onde observa-se que os mesmos apresentaram atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* e não demonstraram atividade contra cepas de *Candida não-albicans*.

Tabela 1. CIMs dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (aduto A e aduto B) sobre cepas do gênero *Candida*.

| Cepas fúngicas | CIMs (µg/mL) | |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | Aduto de Morita- Baylis- Hillman (aduto A) | Aduto de Morita- Baylis-Hillman (aduto B) |
| <i>Candida albicans</i> LM – 703 | 1024 | - |
| <i>Candida albicans</i> ICB 12 | 1024 | - |
| <i>Candida albicans</i> ATCC – 76645 | 256 | 1024 |
| <i>Candida albicans</i> LM – 178 | - | - |
| <i>Candida albicans</i> ATCC – 76485 | - | - |
| <i>Candida guilliermondii</i> LM-103 | - | - |
| <i>Candida tropicalis</i> 10 | - | - |
| <i>Candida tropicalis</i> ATCC – 13803 | - | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> ATCC – 20019 | - | - |
| <i>Candida krusei</i> 120 | - | - |

- : Ausência de atividade nas concentrações testadas.
Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Já na tabela 2, pode-se observar o resultado das CIMs dos antifúngicos caspofungina e anfotericina B frente às cepas fúngicas, onde observa-se que os mesmos apresentaram atividade contra cepas de *Candida albicans* e de *Candida não- albicans*.

Tabela 2. CIMs dos antifúngicos caspofungina e anfotericina B

| Cepas fúngicas | CIMs (µg/mL) | |
|------------------------------------------|--------------|----------------|
| | Caspofungina | Anfotericina B |
| <i>Candida albicans</i> LM – 703 | 4 | 1 |
| <i>Candida albicans</i> ICB 12 | 128 | 0,03 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC – 76645 | 0,5 | 1024 |
| <i>Candida albicans</i> LM – 178 | 16 | 0,5 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC – 76485 | 16 | 2 |
| <i>Candida guilliermondii</i> LM-103 | 2 | 1 |
| <i>Candida tropicalis</i> 10 | 16 | 2 |
| <i>Candida tropicalis</i> ATCC – 13803 | 4 | 2 |
| <i>Candida parapsilosis</i> ATCC – 20019 | 4 | 2 |
| <i>Candida krusei</i> 120 | 4 | 2 |

- : Ausência de atividade nas concentrações testadas.
Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Nas tabelas 3 e 4, encontram-se os valores do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto de Morita-Baylis-Hillman com os antifúngicos.

Tabela 3. Determinação do do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto A e a caspofungina frente a cepa *Candida albicans* ATCC-76645.

| Cepa | CIF ^A | CIF ^B | ICIF | Tipo de interação |
|------------------------------------|------------------|------------------|-------------|-------------------|
| <i>Candida albicans</i> ATCC-76645 | 0.125 | 0.125 | 0.25 | Sinergismo |

**A: Aduto de Morita-Baylis-Hillman; B: Caspofungina
Fonte: Dados da pesquisa (2019).**

Tabela 4. Determinação do do Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o aduto A e a anfotericina B frente a cepa *Candida albicans* ATCC-76645.

| Cepa | CIF ^A | CIF ^B | ICIF | Tipo de interação |
|------------------------------------|------------------|------------------|-------------|-------------------|
| <i>Candida albicans</i> ATCC-76645 | 2 | 0.25 | 2.25 | Indiferente |

**A: Aduto de Morita-Baylis-Hillman; B: Anfotericina B
Fonte: Dados da pesquisa (2019).**

Das e colaboradores²⁶, demonstraram que o aduto de Morita-Baylis-Hillman (Z)-3-(4-metoxibenzilideno)-tiocroman-4-ona apresenta atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* (CIM= 6 µg/ ml) e *Torulopsis glabrata* (CIM=6 µg/ ml) e estudos realizados por Narender²⁷, através do método de difusão em Ágar, encontraram que quinolinas obtidas a partir de adutos de Morita-Baylis-Hilman apresentam atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (MTCC 282), *Chrysosporium tropicum* (MTCC 2821), *Rhizopus oryzae* (MTCC 262), *Fusarium moniliforme* (MTCC 1848), e *Curvularia luneta* (MTCC 2030), e atividade bacteriana contra organismos Gram (+), foram eles: *Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Bacillus sphaericus* (MTCC 11), e *S. aureus* (MTCC 96) e contra organismos Gram (-), foram eles: *Chromobacterium violaceum* (MTCC 2656), *Klebsiella aerogenes* (MTCC 39), e *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741), as CIMs variaram de 12,5 a 25 µg/mL.

Outros estudos relatam que os adutos de Morita-Baylis-Hillman 3-cloro-5-(trifluorometil)-piridin-2-il-oxi) fenila e 3-hidroxi-2-metileno-3-(4-fluorofenil) propanonitrila apresentam potencial atividade para utilização contra parasitas dos gêneros *Leishmania*, *Schistosoma*, *Plasmodium* e *Trypanosoma cruzi*²⁸⁻⁹.

O diferente tipo de interação encontrada entre os fármacos e o aduto de Morita-Baylis-Hillman pode ser atribuído aos mecanismos de ação dos fármacos, onde os mesmos atuam em distintos sítios ativos, proporcionando alteração na interação com a substância³⁰. A anfotericina B, atua ligando-se ao ergosterol da membrana do micro-organismo e interfere nos poros transmembranares, aumentando a permeabilidade da membrana provocando a morte celular fúngica por perda dos seus componentes.

Enquanto a caspofungina, exercem seu mecanismo de ação através da inibição de forma não-competitiva a enzima β (1,3) -D-glucano sintetase, o que inibe a síntese de β (1,3) -D-glucano e afeta a integridade da parede celular fúngica³¹⁻².

Nos últimos anos, houve um aumento da resistência aos antimicrobianos, inclusive dos azólicos, tornando as equinocandinas fármacos de primeira escolha para o tratamento de infecções sistêmicas por *Candida*, no entanto, espécies deste gênero já vem exibindo resistência a esta classe de fármacos, como é o caso da *C. Glabrata*³³.

Com base nos dados apresentados, os adutos de MBH sintetizados foram obtidos com altos rendimentos e em meios reacionais brandos e apresentaram baixa atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, e ausência de atividade contra cepas de *Candida não-albicans*.

4. Conclusão

A associação entre o aduto de MBH 2 - ((2-cloroquinolin-3-il) (hidroxi) metil) acrilato de metilo e o antifúngico caspofungina obtiveram atividade sinérgica, enquanto a interação com a anfotericina B foi indiferente abrindo a possibilidade de utilizá-los de maneira combinada com outros agentes antifúngicos.

Referências

1. Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2016; 73, 179-185.
2. Tayel AA, Moussa S, El-Tras WF, Knittel D, Opwis K, Schollmeyer E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *Int J Biol Macromol.* 2010; 47(4):454-7.
3. Goulart LS, Santiago EF, Ramon JL, Moura SV, Silva AR, Júnior-Silva IF, et al. Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida* spp. in southern Mato Grosso State. *J Bras Patol Med Lab.* 2016; 52(4), 233-237.
4. Pilmis B, Puel A, Lortholary O, Lanternier F. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. *Clin Microbiol Infect.* 2016.
5. Özer, T. T., Durmaz, S., & Yula, E. (2016). Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2016; 22(9), 629-632.
6. Motoa G, Muñoz JS, Oñate J, Pallares CJ, Hernández C, Villegas MV. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. *Rev Iberoamer Micol.* 2016.

7. Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *J prosthet dentist*. 2013; 110(5): 356-362.
8. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003.
9. Jothiprakasam V, Sambantham M, Chinnathambi S, Vijayaboopathi S. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. *Arch Oral Biol*. 2016; 73: 21-24.
10. Giongo JL, Vaucher RA, Fausto VP, Quatrin PM, Lopes LQS, Santos RCV, et al. Anti-*Candida* activity assessment of Pelargonium graveolens oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microbial Pathog*. 2016; 100: 170-178.
11. Rörig KCO, Colacite J, Abegg MA. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(2): 225-7.
12. Abrantes PMS, McArthur CP, Africa CWJ. Multi-drug resistant oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 79(2):222-7.
13. Luna-Freire KR, Scaramal JPS, Resende JALC, Tormena CF, Oliveira FL, Aparicio R, et al. An asymmetric substrate-controlled Morita-Baylis-Hillman reaction as approach for the synthesis of pyrrolizidinones and pyrrolizidines. *Tetrahedron*. 2014; 70(20):3319-3326.
14. Coelho F, Almeida WP. REAÇÃO DE BAYLIS-HILLMAN: uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica. *Quím Nova*. 2000; 23(1): 98-101.
15. Basavaiah D, Reddy BS, Badsara SS. Recent contributions from de Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. *Chem Ver*. 2010; 110: 5447-5674.
16. Luna-Freire KR, Tormena CF, Coelho F. Heck Reaction on Morita-Baylis-Hillman Adducts: Diastereoselective Synthesis of Pyrrolizidinones and Pyrrolizidines. *Synlett*. 2011; 14: 2059-2063.
17. Basavaiah D, Rao KV, Reddy RJ. The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. *Chem Soc Rev*. 2007; 36: 1581 - 1588.
18. Reddy TN, Rao VJ. Importance of Baylis-Hillman adducts in modern drug discovery. *Tetrahedron Let*. 2018; 59, (30): 2859-2875.
19. Amarante GW, Coelho F. An approach for the enantioselective synthesis of biologically active furanones from a Morita Baylis Hillman adduct. *Tetrahedron*. 2010; 66: 6749-6753.

20. Stork G, Takahashi T, Kawamoto I, Suzuki T. Total synthesis of prostaglandin F₂ α by Chirality Transfer from D-glucose. *J American Chem Soc.* 1978; 100(26): 8272-8273.
21. 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 Plan Meds.* 2011; 13(2): 203-8.
22. Cortez LER, Yamaguchi MU, Cortez DAG, Pesco DCS. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). *Mund sau (Impr.)*. 2015; 433-440.
23. Himratul-Aznita WH, Nor-Zulaila CO, Nurul-Fatihah K. Antifungal activity of dual combination of hydroxychavicol with commercialized agents against oral *Candida* species. *SpringerPlus.* 2016; 5(1): 1696.
24. Doern CD. When Does 2 plus 2 Equal 5? A review of Antimicrobial Synergy Testing. *J Clin Microbiol.* 2014; 4124-4128.
25. Ben Yaakov D, Shadkchan Y, Albert N, Kontoyiannis DP, Osherov N. The quinoline bromoquinol exhibits broad-spectrum antifungal activity and induces oxidative stress and apoptosis in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemoth.* 2017; 72(8): 2263-2272.
26. Das B, Chowdhury N, Damodar K, Banerjee J. A. Mild and Efficient Stereoselective Synthesis of (Z)-and (E)-Allyl Sulfides and Potent Antifungal Agent, (Z)-3-(4-Methoxybenzylidene) thiochroman-4-one from Morita-Baylis-Hillman Acetates. *Chem pharm bul.* 2007; 55(8): 1274-1276.
27. Narender P, Srinivas U, Ravinder M, Rao BA, Ramesh Ch, Harakishore K. Synthesis of multisubstituted quinolines from Baylis-Hillman adducts obtained from substituted 2-chloronicotinaldehydes and their antimicrobial activity. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2006; 14(13): 4600-4609.
28. Lima-Junior CG, Vasconcellos ML. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(13): 3954-3971, 2012.
29. Vasconcellos ML, Silva T, Camara CA, Martins RM, Lacerda KM, Lopes HM. Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. *Pest management science.* 2006; 62(3): 288-292.
30. Rezende C, Segura R, Riva SBM, Castro VCO. Mecanismos de ação dos antifúngicos. *UNIFEV: Ciênc Tec.* 2017; 2: 222-236.
31. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int.* 2013: 1-13.

32. Grover N. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian J Pharmacol.* 2010; 42:9.
33. Wiederhold, N. P. Echinocandin resistance in *Candida* species: a review of recent developments. *Curr Infect Dis Rep.* 2016; 18(42): 1-8.