

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](mailto:bcalixto96@gmail.com)

Gustavo Lima Soares  
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba - Brasil  
[guga.limasr@gmail.com](mailto:guga.limasr@gmail.com)

Brenna Ravena Araújo  
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba – Brasil  
[b.ravena@hotmail.com](mailto:b.ravena@hotmail.com)

Kristerson Reinaldo de Luna Freire  
 Universidade Federal da Paraíba– UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil  
[kristerson@gmail.com](mailto:kristerson@gmail.com)

Fernando da Silva Moraes  
 Universidade Federal da Paraíba– UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil  
[souriscanada@gmail.com](mailto:souriscanada@gmail.com)

Wylly Araújo de Oliveira  
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba - Brasil  
[wyllyoliveira@gmail.com](mailto: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 gastrointestinal<sup>1-3</sup>. 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 tratamento<sup>4-6</sup>.

Dentre as infecções causadas por este gênero, a candidíase oral é uma infecção com alta incidência e prevalência em diferentes populações em todo o mundo<sup>7</sup>. 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 aumentando<sup>5</sup>. Essas espécies também são capazes de causar infecções intestinais, de pele e candidemia<sup>8</sup>.

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<sup>1,9-11</sup>.

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 itraconazol<sup>12</sup>.

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 sintético<sup>13-4</sup>. Adendo a isso, o alto rendimento reacional é uma característica inerente a essas reações, pois é uma transformação química com elevada economia de átomos<sup>15-6</sup>.

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 fosfina<sup>17</sup>. 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 outras<sup>18</sup>.

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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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%<sup>19</sup>. IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ): 3537, 3216, 3062, 2992, 2955, 1702, 1619, 1490, 1331, 1138, 1033, 759, 708, 595 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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). <sup>13</sup>C RMN (62,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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%<sup>20</sup>. IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ): 3079, 2949, 1726, 1623, 1435, 1299, 1246, 1153, 1053, 955, 750, 597 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (200MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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). <sup>13</sup>C RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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

Analizou-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 Sabouraud<sup>21-2</sup>.

A concentração do inóculo fúngico foi ajustada de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala McFarland, com aproximadamente 1 - 5 x 10<sup>6</sup> 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  $\mu$ g/mL diluídos seriadamente de 1:2, o experimento foi conduzido com 1 - 5 x 10<sup>5</sup> 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<sup>21,23</sup>.

Já o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) foi calculada através da seguinte fórmula<sup>24</sup>:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B$$

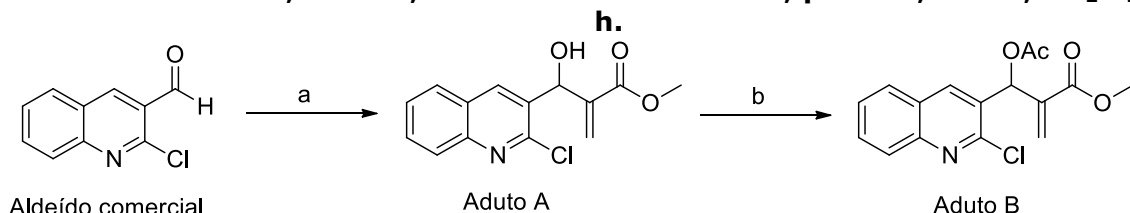
Onde,  $CIF_A = CIM_A$  combinado/  $CIM_A$  sozinho e  $CIF_B = CIM_B$  combinada/  $CIM_B$  sozinho. Foi considerado sinérgico ICIF menor que 0.5, aditivo ICIF entre 0.5 e 1, indiferente ICIF entre 1 e 4 e atividade antagônica com ICIF maior que 4.

### 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.<sup>25</sup>, 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, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 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	<b>1024</b>	-
<i>Candida albicans</i> ICB 12	<b>1024</b>	-
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76645	<b>256</b>	<b>1024</b>
<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	<b>4</b>	<b>1</b>
<i>Candida albicans</i> ICB 12	<b>128</b>	<b>0,03</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76645	<b>0,5</b>	<b>1024</b>
<i>Candida albicans</i> LM – 178	<b>16</b>	<b>0,5</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC – 76485	<b>16</b>	<b>2</b>
<i>Candida guilliermondii</i> LM-103	<b>2</b>	<b>1</b>
<i>Candida tropicalis</i> 10	<b>16</b>	<b>2</b>
<i>Candida tropicalis</i> ATCC – 13803	<b>4</b>	<b>2</b>
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC – 20019	<b>4</b>	<b>2</b>
<i>Candida krusei</i> 120	<b>4</b>	<b>2</b>

- : 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 <sup>A</sup>	CIF <sup>B</sup>	ICIF	Tipo de interação
<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<b>0.125</b>	<b>0.125</b>	<b>0.25</b>	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 <sup>A</sup>	CIF <sup>B</sup>	ICIF	Tipo de interação
<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<b>2</b>	<b>0.25</b>	<b>2.25</b>	Indiferente

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

Das e colaboradores<sup>26</sup>, 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 Narender<sup>27</sup>, 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*<sup>28-9</sup>.

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 substância<sup>30</sup>. 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  $\beta$  (1,3) -D-glucano sintetase, o que inibe a síntese de  $\beta$  (1,3) -D-glucano e afeta a integridade da parede celular fúngica<sup>31-2</sup>.

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*<sup>33</sup>.

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 F<sub>2</sub> $\alpha$  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, Oshero 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.