

Artigo original

Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias

Susceptibility profile to azole antifungal of a mycoteca for strategies to oppose candidemia

Andreza Martins¹, Alexandre Fuentefria¹, Saulo Andrade¹, Gustavo Silveira¹, Irene Kulkamp¹, Bruna Pippi¹, Michel Machado², Luis Oliveira², Leticia Cruz³, Clarissa Frizzo³.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Universidade Federal dos Pampas, Bagé, RS, Brasil.

³Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Submetido em: 11/09/16

Aceito em: 21/12/16

andrezafm20@gmail.com

RESUMO

Justificativa e objetivos: As leveduras do gênero *Candida* causam infecções graves em pacientes debilitados e multi-invadidos resultando em prognósticos ruins com altas taxas de mortalidade. A prevalência de infecções causadas por espécies *não-albicans* tem aumentado muito nos últimos anos levando a uma taxa de cura menor já que são mais resistentes aos antifúngicos azólicos. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de susceptibilidade a derivados azólicos em 114 cepas de leveduras patogênicas do gênero *Candida* depositadas na Micoteca da Faculdade de Farmácia da UFRGS e utilizar estes resultados para fomentar a discussão de estratégias de combate a resistência fúngica. **Métodos:** Avaliou-se o perfil de susceptibilidade frente ao Miconazol, Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol nas 114 cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI. **Resultados:** Aproximadamente 22% dos isolados foram resistentes ao Fluconazol e 47% resistentes ao Itraconazol, ao passo que Miconazol e Cetoconazol tiveram percentuais de 16 e 11% de resistência. A maioria das cepas resistentes eram de *C. tropicalis*, seguido de *C. glabrata*. Estes resultados apontam para a necessidade de novas estratégias terapêuticas, como a associação de fármacos, prospecção de novas moléculas com atividade antifúngica e estratégias de vetorização como a nanoencapsulação. **Conclusões:** A caracterização do perfil de susceptibilidade das cepas analisadas será referência para trabalhos de pesquisa que as utilizam como alvo celular de antifúngicos. Adicionalmente, permitirá direcionar estratégias para a desaceleração do aumento da resistência nestas espécies.

DESCRIPTORES: Resistência. Antifúngicos. Candidíase.

ABSTRACT

Background and Objectives: Candida yeasts genus cause serious infections in immunosuppressed bad prognoses with high mortality rates. and multi-invaded patients resulting in The prevalence of infections caused by non-albicans species has increased in recent years leading to a lower cure rate since they are more resistant to azole antifungals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the susceptibility profile to azole derivatives in 114 strains of pathogenic Candida yeasts deposited in the Library of Faculty of Pharmacy of UFRGS and to use these results to promote the discussion of strategies to oppose fungal resistance. **METHODS:** The susceptibility profile of Miconazole, Ketoconazole, Fluconazole and Itraconazole in the 114 strains of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* were evaluated by broth microdilution test with the CLSI recommendations. **Results:** Approximately 22% of the isolates were resistant to Fluconazole and 47% resistant to Itraconazole, whereas Miconazole and Ketoconazole had 16% and 11% resistance. Most of the resistant strains were *C. tropicalis*, followed by *C. glabrata*. These results point to the need for new therapeutic strategies, such as the association of drugs, the prospection of new molecules with antifungal activity and vectorization strategies such as nanoencapsulation. **Conclusions:** The characterization of the susceptibility profile of the analyzed strains will be a reference for research works that use them as a cellular target of antifungal. Additionally, it will allow directing strategies to slow down the increase of resistance in these species.

KEYWORDS: Resistance. Antifungal Agents. Candidiasis.

INTRODUÇÃO

O impacto clínico das infecções fúngicas tem aumentado muito nos últimos anos, particularmente devido às leveduras do gênero *Candida* sp., as quais constituem a quarta causa mais comum de infecções em unidades de terapia intensiva.¹ A candidíase é a principal infecção oportunista com aumentada incidência de casos nas últimas décadas, com prognósticos muitas vezes de difícil desfecho principalmente em pacientes hospitalizados.² As infecções invasivas causadas pelas diversas espécies patogênicas de *Candida*, por exemplo, tem sido fortemente associadas a altas taxas de mortalidade, alcançando índices de 40% a 60%, independente da complexidade da imunodeficiência do paciente.³ O espectro das infecções por *Candida* são muito heterogêneos, representando desde colonizações assintomáticas da orofaringe, candidíases cutâneas, até desfechos invasivos, incluindo neste estágio as candidemias.²⁻⁴

Embora a *C. albicans* seja ainda a espécie de *Candida* mais frequente isolada nos diferentes tipos de candidíases, as espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) tem emergido com muita rapidez nas últimas duas décadas, caracterizando hoje quase 50% dos isolados em pacientes com imunidade celular fortemente comprometida.⁵ A

prevalência aumentada de espécies de CNA é um fator problemático na terapêutica antifúngica, principalmente nas candidemias. A resistência intrínseca a fármacos antifúngicos nestas espécies é altamente expressa, além de possuírem uma capacidade aumentada de aquisição da resistência quando expostos a subdoses terapêuticas ou mesma a tempos de tratamento insuficientes.³

O corrente uso de agentes antifúngicos, principalmente em países sem políticas de controle da dispensação desses fármacos, suscita preocupações devido a seleção de cepas resistentes. Estudos tem reportado uma elevada incidência de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* que adquiriram resistência aos fármacos de primeira e segunda escolha, principalmente no contexto dos derivados azólicos, considerados o tratamento mais prescrito atualmente. Os mecanismos de resistência adquirida aos derivados azólicos já estão bem elucidados, principalmente as ocorrências de alterações na afinidade dos derivados azólicos ao citocromo P450 da 14 alfa-demetilase (Enzima Erg11p) e na expressão de bombas de efluxo.^{6,7}

Antifúngicos azólicos são divididos em imidazólicos e triazólicos. Ambos possuem uma estrutura formada por um anel contendo cinco átomos, sendo que os imidazólicos possuem dois átomos de nitrogênio e, os triazólicos três átomos de nitrogênio em sua estrutura, os quais são responsáveis pela atividade farmacológica destes fármacos.⁶ O mecanismo de ação de fármacos azólico ocorre na membrana celular fúngica, inibindo a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, dependente do citocromo P – 450. Como consequência, ocorre a inibição da biossíntese do ergosterol da membrana fúngica. Dessa forma, ocorre um acúmulo de esteróis metilados que são tóxicos para o microorganismo além de depleção nos níveis de ergosterol, inibindo o crescimento das células.³ Esse mecanismo está relacionado à ligação da base nitrogenada do anel azólico ao ferro contido no grupamento heme, do substrato do citocromo P450.⁸

Sabendo da importância da terapêutica antifúngica na clínica médica atual, e, sobretudo, da relevância da permanente discussão do atual panorama da resistência dos fungos patogênicos aos agentes antifúngicos atualmente prescritos no Brasil e no mundo, os objetivos desse estudo foram: avaliar o perfil de susceptibilidade e resistência a derivados azólicos em 114 cepas de leveduras patogênicas do gênero *Candida* depositadas na Micoteca da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Desta forma,

o presente trabalho poderá servir de suporte para os trabalhos de pesquisa que utilizam estas cepas como alvo celular para tratamentos antifúngicos. Adicionalmente, estes resultados serviram de embasamento para subsidiar a discussão de possíveis estratégias de combate a resistência fúngica, que vem sido desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa, que são apresentados neste artigo.

MÉTODOS

Um total de 114 leveduras, incluindo *C. albicans* (n=19), *C. glabrata* (n=30), *C. tropicalis* (n=29), *C. parapsilosis* (n=28) e *C. krusei* (n=8) foram utilizados neste estudo. Os isolados depositados na Micoteca da Faculdade de Farmácia da UFRGS são utilizados em diferentes estudos de susceptibilidade a moléculas sintéticas e compostos de origem natural. Todos as cepas tiveram sua identificação confirmada por métodos cromogênicos como o CHROMagar™ Candida (BD, Ontario, Canadá) e com o sistema automatizado de identificação de leveduras VITEK 2 SYSTEM (BioMérieux, Roma, Itália). Diversas cepas possuem ainda sequenciamento da região D1/D2 do DNA ribossomal, como método padrão ouro de confirmação identificatória.

O teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, em placas de microdiluição estéreis, com 96 poços, conforme o padronizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI) no documento M27-A3.⁹ No primeiro poço de cada fileira horizontal da placa, foram colocados 200 µl da droga antifúngica a ser avaliada. No segundo ao décimo primeiro poço 100 µL de caldo RPMI 1640 Gibco® (Gran Island, EUA). Foi retirado 100 µL do primeiro poço para efetuar a microdiluição seriada da droga antifúngica até o décimo poço, sendo descartados os 100 µL restantes. No décimo primeiro poço foram colocados 100 µL de caldo RPMI e 100 µL de inóculo fúngico de cada isolado a ser testado, como controle positivo, e no décimo segundo poço colocam-se 200 µL caldo RPMI, como controle negativo do ensaio. Os testes foram realizados em quadruplicata, para cada cepa de levedura testada. A preparação do inóculo fúngico e das drogas antifúngicas foi realizada também de acordo com as recomendações do CLSI. As microplacas foram incubadas a 35°C por 48hs, para posteriormente ser determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração da substância na qual o microrganismo testado não demonstra crescimento

visível pelo método visual, observado através da formação ou não de um “botão” no fundo do poço da placa. Os derivados azólicos utilizados neste estudo foram o Miconazol (Cristália®), Fluconazol (Cristália®), Cetoconazol (Cristália®) e o Itraconazol (Pfizer®). Os critérios de definição de suscetibilidade ao Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITZ) foram definidos conforme o CLSI levando em consideração o documento M27-S4 da CLSI. Para Miconazol (MCZ) e cetoconazol (CTZ) foram estabelecidos conforme estudos anteriores.^{10,11}

As soluções de trabalho utilizadas nos experimentos foram preparadas a partir dessas soluções estoques no momento do uso e, diluídas em caldo RPMI com tampão MOPS, em pH 7.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade aos antifúngicos azólicos sobre as cepas depositadas de *Candida* spp. são apresentado na tabela 1. Nesta tabela os valores de susceptibilidade estão expressos em concentração inibitória mínima (MIC), valores de MIC₅₀ e MIC₉₀, faixa de CIM e classificação como susceptível, resistente ou dose-dependente.

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade das leveduras patogênicas de espécies de *Candida* frente a antifúngicos imidazólicos e triazólicos.

Espécies n (%)	Antifúngicos	CIM50	CIM90	Faixa de CIM	Suscetível n (%)	Resistente n (%)	Dose Dependente n (%)
<i>C. albicans</i> 19 (16.66)	Fluconazol	1	16	0.25 - > 64	15 (78.95)	3 (15.79)	1 (5.26)
	Itraconazol	0.5	2	0.125 - > 4	2 (10.53)	9 (47.37)	8 (42.10)
	Cetoconazol	0.125	> 8	0.0078125 - > 8	16 (84.21)	3 (15.79)	0
	Miconazol	0.25	2	0.0078125 - > 8	17 (89.47)	2 (10.53)	0
<i>C. glabrata</i> 30 (26.32)	Fluconazol	8	64	0.125 - 128	-	5 (16.67)	25 (83.33)
	Itraconazol	1	> 4	0.03125 - > 4	7 (22.33)	16 (53.34)	7 (23.33)
	Cetoconazol	0.5	4	0.125 - > 8	28 (93.33)	2 (6.67)	0
	Miconazol	0.25	4	0.007825 - > 8	28 (93.33)	2 (6.67)	0
<i>C. krusei</i> 8 (7.02)	Fluconazol	4	32	0.25 - 32	-	8 (100.00)	0
	Itraconazol	1	4	0.125 - > 4	2 (25.00)	6 (75.00)	0

	Cetoconazol	1	1	0,0078125 - > 8	7 (87.50)	1 (12.50)	0
	Miconazol	0.5	2	0,03125 - > 8	7 (87.50)	1 (12.50)	0
<i>C. parapsilosis</i> 28 (24.56)	Fluconazol	1	8	0.03125 - 64	21 (75.00)	4 (14.29)	3 (10.71)
	Itraconazol	0.25	1	0.03125 - 1	13 (46.42)	4 (14.29)	11(39.29)
	Cetoconazol	0.0625	0.25	0.0078125 - 0.25	28 (100.00)	0	0
	Miconazol	1	4	0.125 - > 8	25 (89.29)	3 (10.71)	0
<i>C. tropicalis</i> 29 (25.44)	Fluconazol	2	16	0.25 - > 64	20 (68.97)	6 (20.69)	3 (10.34)
	Itraconazol	1	4	0.25 - >4	0	19 (65.62)	10 (34.48)
	Cetoconazol	1	> 8	0.0078125 - > 8	22 (75.86)	7 (24.14)	0
	Miconazol	2	> 8	0.0078125 - > 8	19 (65.52)	10 (34.48)	0

Do total de cepas testadas, cerca de 22% dos isolados são resistentes ao Fluconazol, 47% são resistentes ao Itraconazol, 16% ao Miconazol e 11% ao Cetoconazol. A maior parte da resistência foi observada nos isolados de *C. tropicalis*, seguido de *C. glabrata* e *C. albicans*. O valor do CIM90 (concentração mínima inibitória do fármaco para inibir 90% de todos os isolados testados) frente ao Fluconazol e Itraconazol mostra a predominância de elevadas doses de triazólicos para alcançar esse espectro de inibição, ao contrário do que se observa com os imidazólicos. Um perfil diferente já pode ser constatado com a CIM50 (concentração mínima inibitória do fármaco para inibir 50% de todos os isolados testados), cuja uma curta faixa de CIM já é suficiente para alcançar esse espectro de inibição.

DISCUSSÃO

O manejo das infecções por *Candida* tem ocasionado inúmeras complicações nas duas últimas décadas, não somente pelo aumento da incidência de infecções invasivas por diferentes espécies desse gênero, mas também pelo limitado número de fármacos antifúngicos disponíveis para tratamentos contínuos e com baixa toxicidade.² Embora os antifúngicos azólicos continuem a predominar como fármacos de escolha para o tratamento das mais diversas infecções causadas por *Candida*, é fundamental o conhecimento e acompanhamento do perfil de resistência de cepas desse gênero.^{3,7} Dentro desse entendimento, esse estudo vem a contribuir com a vigilância desse perfil

epidemiológico de resistência, discutindo como uma centena de cepas patogênicas de *Candida* se comportam frente a dois derivados imizólicos e dois derivados triazólicos comumente utilizados na terapêutica antifúngica do Brasil. Foi possível constatar neste estudo um elevado perfil de resistência, principalmente das emergentes espécies de CNA, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, espécies que vem evoluindo na seleção de cepas multirresistentes em todo o mundo na atualidade e são objeto de discussão e alerta dos principais comitês mundiais de monitoramento da resistência aos antimicrobianos.^{2,12}

Em um estudo de escala mundial realizado entre 1997 a 2003, importantes variações e taxas elevadas de resistência já tinham sido observadas entre os isolados de *C. glabrata* (14,3 % a 22,8 %).¹³ A frequência desta espécie quando isolada de pacientes com candidemia varia de acordo com a região geográfica, e o mesmo acontece com a frequência da resistência ao FLZ.^{13,14} Nas regiões onde *C. glabrata* é mais comum, como na América do Norte, a taxa de resistência é maior. Já na América Latina e Ásia-Pacífico, regiões em que esse micro-organismo é menos encontrado, os isolados apresentam menor resistência.¹⁴

Nosso estudo corrobora com os resultados de estudos mundiais que ressaltam a *C. tropicalis* como uma espécie modelo na aquisição da resistência aos antifúngicos azólicos.^{1,3,12} Inicialmente a incidência da *C. tropicalis* estava mais concentrada nos países tropicais e subdesenvolvidos, entretanto na última década, conjuntamente com a distribuição das candidíases invasivas em todo o mundo, casos de mortalidade por fungemias causadas por *C. tropicalis* se distribuíram no mundo todo.² A associação de candidíases invasivas por esta espécie em pacientes com tumores sólidos ou mesmo leucemia aguda mostrou uma fortíssima correlação, a ponto de especialistas mundiais apontarem a *C. tropicalis* como um marcador oportunista dessas malignidades e, obviamente, um importante complicador clínico do prognóstico desses pacientes.^{2,7}

A constatação em nosso estudo da necessidade de altas concentrações para o sucesso de inibição do MIC90 corrobora com trabalhos publicados em diversos países, onde alerta-se para o aumento da resistência aos antifúngicos devido a utilização de elevadas doses destes fármacos nos tratamentos dos diversos tipos de candidíases.¹² A grande maioria dos estudos na atualidade ressaltam a importância de adotar-se estratégias terapêuticas que diminuam a constância de aplicação dessas excessivas doses.

Este cenário, aponta fortemente para a necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas, que nosso grupo de pesquisa vem trabalhando fortemente em diferentes vertentes para o combate desta problemática. Estas estratégias incluem: I) associação de fármacos; II) Modelagem molecular e síntese orgânica de novas moléculas bioativas, III) Prospecção de substâncias naturais com atividade antifúngica; IV) vetorização de fármacos, substâncias sintéticas ou naturais através de alternativas tecnológicas como a nanoencapsulação.

Diversas correntes apontam para a associação de antifúngicos, possibilitando a potencialização da eficácia de cura aliada a uma baixa toxicidade.^{3,7,16} A terapia de combinação antifúngica é atraente uma vez que oferece a possibilidade de sinergia ou, pelo menos, aditividade entre os fármacos utilizados.¹⁶ O sinergismo é definido como um aumento da eficácia do efeito antifúngico em uma magnitude maior que a soma dos efeitos de cada antifúngico sozinho.¹⁷ Distintos mecanismos de ação atuando juntos de forma a ter alvos complementares dentro das células fúngica podem inibir diferentes estágios nas vias bioquímicas intracelulares fúngica ou mesmo aumentar a penetração do outro agente antifúngico.^{3,18,19} Quando a estratégia antifúngica adotada apresenta sinergismo, ela pode ser utilizada para melhorar a eficácia da terapia antifúngica em infecções difíceis de tratar, expandindo a atividade antifúngica.²⁰

Em outra vertente, a prospecção de novas moléculas também desponta com alto potencial de atividade biológica, pois permite tanto explorar novos alvos terapêuticos quanto propor novas maneiras de atuar sobre alvos terapêuticos já estabelecidos. Nosso grupo de pesquisa vem no último triênio prospectando atividade antifúngica em diferentes classes de moléculas inéditas, sempre com o intuito de identificar alternativas mais ativas e menos tóxicas que as classes atualmente disponíveis na clínica médica.²¹⁻²⁴ Outra possibilidade no combate a resistência é o uso de substâncias naturais. Estas podem ser utilizadas isoladamente, ou em associação com fármacos antifúngicos, permitindo a quimiossensibilização e redução de doses.^{17,25,26}

Ainda, uma estratégia promissora que vem sendo trabalhada em nosso grupo de pesquisa, é o desenvolvimento de formulações tecnológicas para veiculação de fármacos antifúngicos. O uso, por exemplo, de nanocarreadores, tem demonstrado a possibilidade de melhorar a eficácia do tratamento, reduzindo doses e até mesmo revertendo a resistência em cepas fúngicas.^{27,28}

Estas estratégias podem ser associadas como, por exemplo, a nanoencapsulação de substâncias naturais, apresentando resultados bastante promissores tanto no que tange à susceptibilidade fúngica, quanto a demonstrar atividade em cepas resistentes.²⁹ Ainda, vem-se trabalhando na nanoencapsulação de moléculas bioativas sintetizadas racionalmente para o combate às candidemias.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem uma maior resistência aos antifúngicos triazólicos em diferentes cepas de espécies patogênicas de *Candida*. A caracterização do perfil de susceptibilidade e resistência a derivados azólicos das 114 cepas analisadas no presente estudo, será referência para os trabalhos de pesquisa que utilizam estas cepas como alvo celular para tratamentos antifúngicos.

Adicionalmente, a caracterização do perfil de susceptibilidade das leveduras presentes nesta Micoteca, permitirão, ainda, direcionar estratégias para a desaceleração do aumento da resistência nestas espécies. O perfil de susceptibilidade observado neste estudo representa um importante panorama da atual resistência aos antifúngicos no Brasil, apontando a importância de discutir novas alternativas terapêuticas, como a associação de antifúngicos, a síntese de moléculas bioativas, a prospecção de produtos naturais com atividade antifúngica e o uso de estratégias tecnológicas como a nanoencapsulação.

AGRADECIMENTOS

Alexandre M. Fuentefria, Andreza Francisco Martins e Clarissa P. Frizzo agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade.

REFERÊNCIAS

1. Santos C, Lima N, Sampaio P, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71(3):304 - 308. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.07.002
2. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J of Intern Med* 2016; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.ejim.2016.06.029
3. Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med* 2016; 3 (11):15:3-11. DOI: 10.3389/fmed.2016.00011

4. Gullo A. Invasive fungal infections the challenge continues. *Drug* 2009; 69:65-73. DOI:10.2165/11315530-000000000-00000
5. Serefhanoglu K, Timurkaynak F, Can F, et al. Risk factors for candidemia with non-*albicans* *Candida* spp. in intensive care unit patients with end-stage renal disease on chronic hemodialysis. *J Form Med Associat* 2012; 111(6):325 - 332. DOI: 10.1016/j.jfma.2011.03.004
6. Sahu Jk, Ganguly S, Kaushik A. Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. *Chin J Nat Med* 2013; 11: 456 – 465. DOI: 10.1016/S1875-5364(13)60084-9
7. Srinivasan A, Opez-Ribot JI, Ramasubramanian Ak. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol* 2014; 11:65-71. DOI: 10.1016/j.ddtec.2014.02.005
8. Shalini K, Kumar N, Drabu S, et al. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beil J Org Chemist* 2011; 7: 668 - 677. DOI: 10.3762/bjoc.7.79
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.
10. Isham N & Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. *Mycos* 2010; 53(5):434-7. DOI:10.1111/j.1439-0507.2009.01728.x
11. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AO, et al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2011; 56:549-555. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2010.11.018
12. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* 2013; 60(11): B4698.
13. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2009; 13 (6): 180-195. DOI: 10.1016/j.drug.2010.09.002
14. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20 (1): 133-166. DOI: 10.1128/CMR.00029-06
15. Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: a review. *Drug Tod* 2015; 51(12): 705-718. DOI: 10.1358/dot.2015.51.12.2421058
16. Ostrosky-Zeichner L. Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(4): 65 - 70. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.01983.x
17. Pippi B, Dalla Lana AJ, Moraes RC, et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol* 2015; 118(4):839-50. DOI: 10.1111/jam.12746
18. Mukherjee P, Sheehan D, Hitchcock C, et al. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 (1): 163-194. DOI: 10.1128/CMR.18.1.163-194.2005

19. Liu L, Ding H, Wang B, et al. Synthesis and evaluation of novel azoles as potent antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24 (1): 192 - 194. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.11.037
20. Spader TB, Venturini TP, Rossato L, et al. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. *Rev Ibero Micol* 2013; 30(3): 200 - 204. DOI:10.1016/j.riam.2013.01.002
21. Ribas AD, Del Ponte EM, Dalbem AM, et al. Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *J Appl Microbiol* 2016; 121 (2): 445-452. DOI: 10.1111/jam.13125
22. Dalla Lana DF, Donato RK, Bündchen C, et al. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J Appl Microbiol* 2015; 119 (2): 377-388. DOI: 10.1111/jam.12862
23. Casanova BB, Muniz MN, De Oliveira T, et al. Synthesis and biological evaluation of hydrazone derivatives as antifungal agents. *Molecules* 2015; 20(5):9229-9241. DOI: 10.3390/molecules20059229
24. Innocente A, Casanova BB, Klein F, et al. Synthesis of isosteric triterpenoid derivatives and antifungal activity. *Chem Biol Drug Des* 2014; 83 (3): 344-9. DOI: 10.1111/cbdd.12251
25. Machado G, Pippi B, Dalla Lana D, et al. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. *Pharmaceut Biol* 2016; 54 (11): 2410-2419. DOI: 10.3109/13880209.2016.1158286
26. Rosa HS, De Camargo VB, Camargo G, et al. Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R.E. Fries (Malvaceae): chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity. *Food Chem* 2015; 182:193-199. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.144
27. Fuentesfria AM, Jesus RS, Back PI, et al. Ketoconazole-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules for Improved Antifungal Activity Against *Candida* spp. *Lat Americ J Pharm* 2014; 33:1589-1595. DOI: 10.1007/s11046-013-9622-7
28. Moazeni M, Kelidari HR, Saeedi M, et al. Time to overcome fluconazole resistant *Candida* isolates: Solid lipid nanoparticles as a novel antifungal drug delivery system. *Coll Surf B Biointerf* 2016; 142: 400-407. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.013
29. Svetlichny G, Kulkamp IC, Cunha SL, et al. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. *Pharm* 2015; 70 (3):155-164.