

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Atividade de Trabalho de Conclusão de Curso

**Investigação *in vitro* da atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa*  
(WILLD) D.C. frente a leveduras patogênicas**

**Renata Cougo Moraes**

Porto Alegre, novembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Atividade de Trabalho de Conclusão de Curso

**Investigação *in vitro* da atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa*  
(WILLD) D.C. frente a leveduras patogênicas**

**Renata Cougo Moraes**

Trabalho de Conclusão

da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

Prof. Dr. George González Ortega

Orientador

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-orientador

Porto Alegre, novembro de 2011

“O que sabemos é uma gota,  
o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas do LDG da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial aos queridos colegas Samuel Kaiser e Simone Gasparin Verza pela colaboração durante todo o período desse trabalho.

Às colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador Prof. Dr. George González Ortega pelos conselhos, amizade e atenção constante não somente na realização do trabalho, mas também na continuidade do aprendizado da sala de aula para os laboratórios.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria pela transmissão de novos conhecimentos e por ter me acolhido em seu laboratório.

Aos meus familiares por toda a paciência, apoio e carinho durante toda a minha vida, impossível mencionar a todos, assim como é impossível não lembrar de todos com amor e saudades. Em especial a minha mãe, Eliane Teresinha Castro Cougo, pelo incentivo e por sempre acreditar na minha capacidade, e ao meu pai, Renato Vianna Moraes (*in memoriam*), por ter me passado o amor pela área da saúde.

Ao meu namorado, Luiz Henrique Longhi Rossi, pelo amor incondicional durante todos esses anos, pelo companheirismo, pelas incontáveis vezes que soube ouvir minhas ansiedades, pelas palavras críticas e sensatas, além de estar sempre presente em minha vida, vibrando comigo a cada conquista.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho que é o final de um começo, o meu muito obrigada!

**Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology.**

Normas do periódico em anexo.

(As tabelas e figuras estão inseridas ao longo do trabalho para facilitar a leitura)

**Investigação *in vitro* da atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa*  
(WILLD) D.C. frente a leveduras patogênicas**

**MORAES, R.C<sup>1\*</sup>; LANA, A.D<sup>2</sup>; PIPPI, B<sup>2</sup>; KAISER, S<sup>1</sup>; VERZA, S.G<sup>1</sup>;  
FUENTEFRÍA, A<sup>2</sup>; ORTEGA, G.G<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Micologia Aplicada, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

## **RESUMO**

**Relevância Etnofarmacológica:** *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) é uma videira de ampla distribuição nas florestas tropicais das Américas, recentemente incluída na Farmacopéia Americana e consta entre as espécies vegetais mais intensamente estudadas nos últimos anos. A espécie tem sido usada tradicionalmente no tratamento de doenças reumáticas, câncer, assim como para alergias e infecções microbianas. As três frações bioativas reconhecidas incluem: alcalóides oxindólicos (**F<sub>ALC</sub>**), polifenóis (**F<sub>POLIF</sub>**) e derivados triterpênicos do ácido quinóico (**F<sub>AQ</sub>**). **Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo a investigação da atividade antifúngica de extrato bruto e de frações de *U. tomentosa* frente a leveduras patogênicas. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados o extrato bruto de cascas, frações purificadas de **F<sub>AQ</sub>** e **F<sub>ALC</sub>**, obtidas por técnicas de fracionamento em fase sólida, e a fração **F<sub>POLIF</sub>**, obtida por precipitação. Os teores de triterpenos e de alcalóides oxindólicos pentacíclicos foram determinados por CLAE-DAD, e o de polifenóis totais por Folin Ciocalteu. O ensaio antifúngico de triagem, a determinação da concentração inibitória mínima (**CIM**) e a avaliação de sinergismo entre as frações purificadas e o fluconazol foram realizados segundo as recomendações do documento M27-A3 da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de 2008. **Resultados:** No teste de triagem, tanto o extrato bruto quanto as frações

---

\* Autor para correspondência: +55 (51) – 3308 5231  
Email: [renata.moraes@ufrgs.br](mailto:renata.moraes@ufrgs.br) (Moraes, R.C)

causaram inibição de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Os valores de CIM indicam uma atividade significativa da fração  $F_{POLIF}$ , na faixa de inibição de 7,81 a 15,62  $\mu\text{g/mL}$  frente a *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. A fração  $F_{AQ}$  também se mostrou ativa, porém, em menor escala. Ambas as frações também demonstraram efeito sinérgico com fluconazol, obtendo um resultado de inibição de 0,98  $\mu\text{g/mL}$  frente a *C. krusei*, uma cepa intrinsecamente resistente a esse antifúngico azólico. **Conclusões:** A atividade frente a leveduras patogênicas e o forte indício de atividade sinérgica com fluconazol são inéditos para a espécie e abrem uma nova perspectiva de pesquisa sobre as frações de triterpenos e polifenóis de unha-de-gato.

**Palavras-chave:** *U. tomentosa*; Antifúngico; Polifenóis; Triterpenos; Sinergismo.

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological Relevance:** *Uncaria tomentosa* (cat's claw) is a vine widely distributed in tropical forests of South America, recently included in the United States Pharmacopoeia. Moreover, cat's claw is one of most intensively studied medicinal herbal in recent years. The species has been traditionally used in the treatment of rheumatic diseases, cancer, as well as microbial infections and allergies. The three bioactive fractions recognized include: oxindole alkaloids ( $F_{ALC}$ ), polyphenols ( $F_{POLIF}$ ) and triterpenic acid derivatives quinovic ( $F_{AQ}$ ). **Objective:** This study aims to investigate the antifungal activity of crude extract and fractions of *U. tomentosa* against pathogenic yeasts. **Materials and Methods:** A crude extract from its bark as well the purified fractions  $F_{ALC}$  and  $F_{AQ}$ , previously obtained by fractioning solid-phase techniques, and  $F_{POLIF}$  fraction, obtained by precipitation, were prepared for that intend specifically. The contents of triterpenes and pentacyclic oxindole alkaloids were determined by HPLC-DAD. The total polyphenols content was estimated through Folin Ciocalteu assay. For testing antifungal screening, the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and the assessment of synergism between fluconazole and purified fractions were performed according to the recommendations of the document M27-A3 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2008. **Results:** In the screening test, both the crude extract

and purified fractions were able to inhibit *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* growth. Regarding the F<sub>POLIF</sub> fraction, MIC values ranging from 7.81 to 15.62 µg/mL against *C. glabrata* and *C. parapsilosis* suggested a profitable antifungal activity for that fraction. F<sub>AQ</sub> fraction was also active but to a lesser extent. Nonetheless, both fractions showed a perceptible synergistic effect with fluconazole, as noticed by growth inhibition with a 0.98 µg/mL concentration against *C. krusei*, the last one a recognized azole-resistant strain. **Conclusions:** Both the antifungal activity against pathogenic yeasts and the strong evidence of synergistic activity with fluconazole are first-time reported to Cat's Claw bioactive derivative as far as we know. This found discloses new research perspectives on the antifungal activity of polyphenols and triterpene fractions of Cat's Claw. Further studies to enlighten the activity extent and antifungal mechanism are in progress.

Keywords: *U. tomentosa*; Antifungal; Polyphenols; Saponins; Synergy.

## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras, principalmente espécies de *Candida* spp, são tidas como os principais agentes causadores de micoses oportunistas (Saghrouni *et al.*, 2011). Historicamente, a *Candida albicans* é a espécie mais freqüente envolvida na candidíase, sendo que a participação de espécies não-*albicans* tem aumentado significativamente nos últimos anos devido ao aumento da expressão de fatores de virulência e da aquisição da resistência aos antifúngicos (Méan *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 1996).

Apesar dos potentes agentes antifúngicos disponíveis, a taxa de mortalidade é alta (Eggimann *et al.*, 2003), principalmente em pacientes imunossuprimidos e imunodeprimidos, como pacientes portadores de HIV, em tratamento quimioterápico, ou que tenham sido submetidos a transplante de órgãos ou procedimentos cirúrgicos de médio a grande porte (Endo *et al.*, 2010; Yongmoon Han, 2007). Além disso, existe um interesse crescente na procura de novos fármacos antifúngicos que apresentem maior seletividade e menor toxicidade, pois o uso indiscriminado de agentes antifúngicos vem acarretando em um acelerado aumento da resistência desses microrganismos (Sojakova *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, tem-se evidenciado interesse em tratamentos à base de produtos naturais para a terapia de candidíases (Correa *et al.*, 2002). Nesse contexto, a espécie *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. (*Rubiaceae*), que é extensamente utilizada na medicina tradicional, sobretudo em países da América do Sul como o Peru e Brasil, para o tratamento de doenças reumáticas, úlceras gástricas, infecções virais, alergias e asma, parece ser promissora devido à diversificada natureza química dos compostos dela isolados (Reinhard, 1999). Conhecida popularmente como unha-de-gato devido à presença de espinhos lenhosos, a espécie é composta por alcalóides oxindólicos pentacíclicos (Wagner *et al.*, 1985; Hemingway; Phillipson, 1974; Laus *et al.*, 1997), triterpenos derivados do ácido quinóico (Aquino *et al.*, 1990; 1991; 1997) e polifenóis, como ácidos fenólicos, monômeros de flavonóides e polímeros de elevada massa molecular, como taninos (Heitzman *et al.*, 2005). Dentre às atividades comprovadas cientificamente para a espécie, cabe destacar a antiproliferativa (Gonzalez & Valerio, Jr., 2006), imunestimulante (Lemaire *et al.*, 1999), antiinflamatória (Aguilar *et al.*, 2002),

antiviral (Reis *et al.*, 2008) e antioxidante (Pilarski *et al.*, 2006). No entanto, em relação à atividade antifúngica de *U. tomentosa* os dados encontrados na literatura são incipientes, existindo apenas um relato no qual se evidencia melhora clínica em pacientes com candidíase oral, após tratamento com gel contendo extrato de *U. tomentosa* (Paiva *et al.*, 2009).

Embora existam relatos de ação antimicrobiana, a atividade antifúngica de *U. tomentosa* ainda não foi prospectada de modo aprofundado. Em vista disso, esse estudo visa à obtenção de frações enriquecidas ou purificadas das três frações bioativas identificadas para a espécie possibilitando a realização de ensaios bioguiados. Portanto, este trabalho tem como objetivo a investigação da atividade antifúngica de extrato bruto e frações bioativas purificadas de cascas de *U. tomentosa* frente a leveduras patogênicas relevantes, bem como a avaliação de um possível efeito sinérgico entre as frações testadas e fluconazol, um dos principais antifúngicos disponíveis no mercado.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Solventes, reagentes e equipamentos**

Metanol (Nuclear Brasil); etanol P.A (Nuclear, Brasil); acetonitrila (Tédia, USA); ácido fórmico (Tédia, USA); acetato de amônio (Tédia, USA); reagente de Folin-Ciocalteu 1N (Próton, Brasil); polivinil-polipirrolidona (BASF, Alemanha); resina fortemente aniônica (Dowex Marathon, Sigma Aldrich, USA); resina macroporosa de poliestireno (Diaion HP-20, Supelco, EUA); fluconazol (Cristália, Brasil); anfotericina B (Cristália, Brasil); ágar-Sabouraud (Difco, Brasil); RPMI-MOPS (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA - tampão MOPS-Sigma); liofilizador (Modulyo 4 L, Edwards, EUA); rotaevaporador (Büchi, Alemanha); estufa (WTB Binder D100, Germany); agitador magnético (Büchi, Alemanha).

## 2.2 Material vegetal

Uma amostra autêntica de cascas do caule de *U. tomentosa* (lote 0107/06) foi gentilmente cedida pelo Laboratório Induquímica S.A. (Lima, Peru).

## 2.3 Preparação do extrato liofilizado de *U. tomentosa* e suas frações

### 2.3.1 Extrato Bruto Liofilizado (EXT):

O extrato de cascas foi preparado mediante maceração estática com agitação ocasional (uma vez ao dia), durante 4 dias com solução hidroetanólica 40% (v/v), na proporção droga:solvente 1:10 (m/v). A mistura foi prensada em filtro-prensa, filtrada em papel Whatmann Nº2, e concentrada sob vácuo a 50 °C até metade do volume original. A solução extrativa concentrada foi congelada e posteriormente liofilizada.

### 2.3.2 Obtenção da fração purificada de polifenóis

A fração purificada de polifenóis foi obtida a partir da solução extrativa concentrada após resfriamento a 7 °C durante 24 h e filtração a vácuo. O precipitado formado foi separado mediante filtração em papel Whatmann Nº2, seco em estufa a 37 °C durante 24 h. O produto foi denominado **fração purificada de polifenóis (F<sub>POLIF</sub>)**.

### 2.3.3 Obtenção das frações purificadas de alcalóides oxindólicos pentacíclicos (F<sub>ALC</sub>) e de triterpenos (F<sub>AQ</sub>) (Borré, 2010)

#### 2.3.3.1 Obtenção do Extrato Pré- Purificado

Uma amostra de EXT liofilizado foi primeiramente reconstituído em 200 mL de solução hidroetanólica 40% (v/v), de modo a obter uma concentração final de 0,85 g% (m/v). Como etapa de pré-purificação, a solução obtida foi submetida à agitação vigorosa com polivinil-polipirrolidona (PVPP) na proporção resíduo seco:PVPP de 1:10 (m/m), durante 60 minutos e

temperatura ambiente. A mistura foi filtrada sob vácuo e o filtrado acidificado com solução de ácido fórmico 10% (v/v), a pH 3,0, obtendo-se o **extrato pré-purificado (EPP)**.

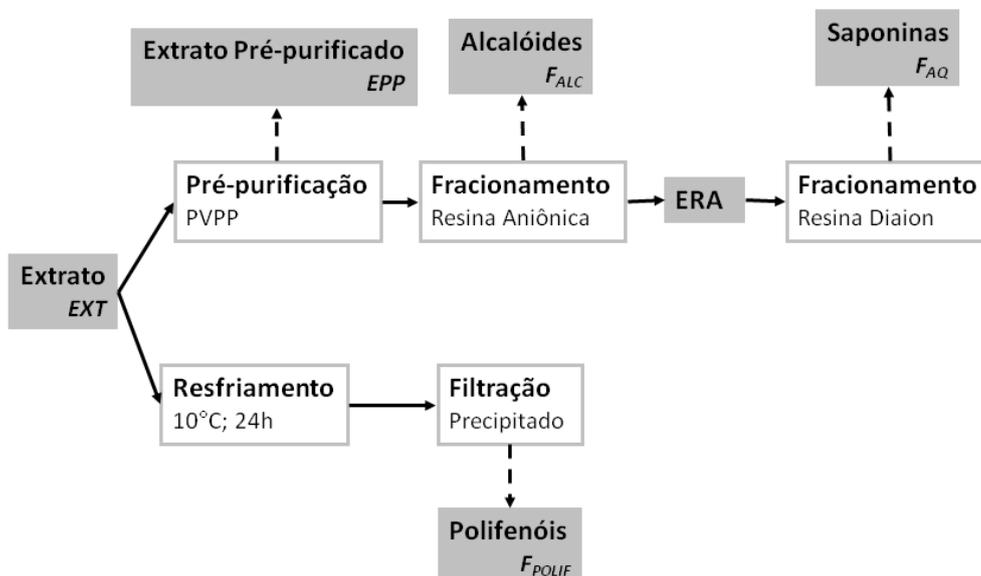
#### *2.3.3.2 Obtenção da fração purificada de alcalóides com resina de troca-iônica*

Um volume de 200 mL de EPP foi submetido ao processo de separação de troca-iônica de 4 etapas, utilizando resina fortemente aniônica, acondicionada em coluna de vidro (50 x 3 cm), com leito de resina de 98,91 cm<sup>3</sup>, mantendo-se fluxo de 5,0 mL/min. O eluato resultante desta primeira etapa foi reservado para análise posterior. Na segunda etapa o leito de resina foi lavado com 150 mL de solução hidroetanólica 40% (v/v), sob fluxo de 5,0 mL/min. Os eluatos obtidos na primeira e segunda etapa foram misturados e posteriormente concentrados a 50 °C até metade de seu volume original, congelada e liofilizada do modo usual, obtendo-se assim **o eluato de primeira passagem** da resina aniônica (**ERA**), que contém, principalmente, polifenóis de baixa massa molecular e triterpenos. Na terceira etapa o leito de resina foi tratado com 300 mL de tampão acetato de amônio 0,3 M (pH 7,0), mantendo fluxo de 5,0 mL/min. O eluato obtido nesta etapa foi descartado. A quarta etapa (remoção dos alcalóides retidos no leito da resina) foi realizada adicionando 300 mL de solução hidroetanólica 80% (v/v), sob fluxo de 5,0 mL/min. O eluato obtido, ricos em alcalóides, foi concentrado sob vácuo a 40 °C, até um quarto de seu volume original, congelado e liofilizado (**F<sub>ALC</sub>**).

#### *2.3.3.3 Obtenção da fração purificada de triterpenos em fase polimérica sólida*

O fracionamento utilizando resina poliaromática objetivou a obtenção de uma fração purificada de triterpenos de *U. tomentosa*. Para tanto, 300 mg de ERA foram dissolvidos em 200 mL de água destilada e fracionados em coluna de vidro (60 x 2 cm), empacotada com resina macroporosa de poliestireno sendo o volume do leito de 94,2 cm<sup>3</sup>. Para a eluição dos triterpenos foram utilizados volumes de 200 mL de soluções de metanol:água em gradiente de polaridade crescente (30, 50, 70, 90%; v/v), seguido de 100 mL de metanol, mantendo o fluxo constante de 2,5 mL/min. Os eluatos obtidos com

metanol:água 90% (v/v) e metanol foram reunidos, concentrados sob vácuo a 50 °C até um quarto do seu volume original, congelados e liofilizados, obtendo-se a fração de triterpenos ( $F_{AQ}$ ). Todas as demais frações não foram consideradas no presente estudo.



**Figura 1** - Descrição dos processos para obtenção das frações purificadas

## 2.4 Quantificação dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos, de triterpenos e dos polifenóis:

### 2.4.1 Análise dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos por CLAE- DAD

A análise teve por base o método preconizado por Kaiser (2011). Resumidamente, utilizou-se como fase móvel tampão acetato de amônio 10 mM (pH 7,0):acetonitrila em sistema gradiente, com detecção em 245 nm, empregando mitrafilina e isomitrafalina como padrões externos.

### 2.4.2 Análise de triterpenos por CLAE-DAD (Pavei, 2010a)

O teor de triterpenos foi determinado utilizando-se como fase móvel ácido fórmico 0,01% (v/v), fase (A), e acetonitrila/ácido fórmico 0,01% (v/v) (90:10, v/v), fase (B), em sistema gradiente, com detecção em 205 nm, utilizando  $\alpha$ -hederina como padrão externo.

### 2.4.3 Determinação dos polifenóis totais por método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Borré, 2010)

Separadamente, alíquotas de 2 mL das soluções extrativas previamente diluídas em água foram adicionados de 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água purificada em balão volumétrico de 25,0 mL. O volume foi ajustado com solução de carbonato de sódio a 20% (m/v). A absorvância foi lida em 760 nm após 30 min da adição da solução de carbonato de sódio, de modo a obter leituras na faixa de 0,2 a 0,8 U.A. Como padrão externo foi utilizado a epicatequina. Soluções de compensação (branco) foram obtidas substituindo o volume de amostra por água purificada.

## 2.5 Avaliação da atividade antifúngica

### 2.5.1 Leveduras e preparo do inóculo

Foram utilizados nesse estudo coleções de cultura de origem clínica depositados na micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: *C. albicans* ATCC 10231, ATCC 18804, ATCC 24433, ATCC 28367, CAL 02 e CAL 04; *C. glabrata* CG 03, CG 09, CG 10, CG 40039 e CG 40136; *C. krusei* CK 01, CK 02, CK 04, CK 05 e CK 6258; *C. parapsilosis* CP 01, CP 03, CP 04, CP 08 e CP 10 e *C. tropicalis* CT 56.

Os inóculos foram preparados de acordo com as recomendações da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, M27-A3, 2008). Os inóculos foram preparados a partir de uma a três colônias com crescimento de 24h em meio de ágar Sabouraud as quais foram ressuspendidas em solução salina estéril, a fim de se obter uma turbidez correspondente a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. Esta suspensão foi diluída 1:100, seguida de uma nova diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640.

### 2.5.2 Preparo das amostras de *U. tomentosa* e dos controles antifúngicos

As amostras testadas, EXT, EPP, F<sub>ALC</sub>, foram dissolvidas em metanol 10% (v/v), enquanto que F<sub>AQ</sub> e F<sub>POLIF</sub> foram dissolvidas em metanol:tampão TBS (tampão Tris-salina) 10:90 (v/v). Todas as amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL.

Para fins de comparação os controles de antifúngicos com anfotericina B, na concentração de 64 µg/mL (C<sub>ANF</sub>), e fluconazol, na concentração de 64 µg/mL (C<sub>FLU</sub>), foram dissolvidos em água.

Os diluentes utilizados para dissolver as amostras testadas (C<sub>DIL</sub>), assim como o controle positivo (C<sub>P</sub>) utilizado para verificar crescimento dos inóculos e o controle negativo (C<sub>N</sub>) contendo somente caldo de ágar-Sabouraud, foram utilizados como controles.

### 2.5.3 Screening da Atividade Antifúngica

Foi utilizada a técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços, como meio de cultura foi utilizado o caldo de ágar-Sabouraud.

As amostras anteriormente preparadas e os controles foram testados frente a *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (CG 40136), *C. krusei* (CK 6258), *C. parapsilosis* (CP 08) e *C. tropicalis* (CT 56). As microplacas foram incubadas por 48 h, a 37 °C. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

### 2.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores de CIM foram determinados por microdiluição em caldo, de acordo com a CLSI, com RPMI-MOPS (meio RPMI 1640 contendo *L*-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com 0,165 mol L<sup>-1</sup> de tampão MOPS), como meio de cultura. As substâncias foram testadas na faixa de concentração de 500 a 1,95 µg/mL frente às diferentes espécies de *Candida* que apresentaram atividade no *screening*. No total, foram testadas cinco cepas de cada espécie. Comparativamente, foram testadas simultaneamente as frações F<sub>AQ</sub> e F<sub>POLIF</sub> juntos, a fim de avaliar um possível efeito sinérgico entre ambas as frações. Para tanto, foram inoculados 100 µL, tanto das amostras

quanto dos inóculos, nos poços, com exceção do C<sub>N</sub>, no qual foi inoculado 200 µL de ágar-Saboraud. As microplacas foram incubadas por 48 h, a 35 °C. A CIM foi definida como a menor concentração de compostos em que as leveduras testadas não demonstraram crescimento visível. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### 2.5.6 Avaliação de sinergismo

Foram avaliados o sinergismo exclusivamente das frações que apresentaram atividade frente às *candidas* testadas, com fluconazol, antifúngico amplamente utilizado no mercado. Fluconazol (**FLU**) foi preparado na concentração de 16 µg/mL (metade da CIM usado no controle antifúngico). Além da solução de fluconazol as seguintes soluções foram ensaiadas: FLU+ F<sub>POLIF</sub>; FLU+ F<sub>AQ</sub> e de FLU+ F<sub>POLIF</sub>+ F<sub>AQ</sub>. Para tanto, F<sub>AQ</sub> e F<sub>POLIF</sub> foram preparados na concentração correspondente à metade da CIM frente a cada cepa utilizada.

Posteriormente, foi avaliada a CIM de acordo com o procedimento descrito no item 2.5.4.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Quantificação de Extrato e Frações de *U. tomentosa*

Os resultados de quantificação de alcalóides, triterpenos e polifenóis obtidos para as diferentes frações de *U. tomentosa* encontram-se sumarizados na tabela 1.

Pela análise dos resultados pode-se verificar que os processos de fracionamento permitiram a obtenção de frações enriquecidas e purificadas de alcalóides, triterpenos e polifenóis. Na fração F<sub>ALC</sub> somente foram detectados alcalóides. Em F<sub>AQ</sub> só foi evidenciada a presença de triterpenos, do mesmo modo que na F<sub>POLIF</sub> os principais compostos presentes foram caracterizados como polifenóis, com a concomitante ausência de triterpenos e alcalóides. Em EPP, foi verificada uma quantidade menor de polifenóis, fato que se explica

pela realização de uma purificação prévia com PVPP, cujo objetivo é remover os polifenóis de alta massa molecular.

**Tabela 1** - Resultado da quantificação do extrato e frações de *U. tomentosa*.

	<b>EXT</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>EPP</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>F<sub>POLIF</sub></b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>F<sub>ALC</sub></b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>F<sub>AQ</sub></b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Alcalóides	15,35 $\pm 0,19$	18,20 $\pm 0,26$	ND	62,73 $\pm 0,16$	ND
Triterpenos	67,76 $\pm 1,38$	69,97 $\pm 0,12$	ND	ND	217,80 $\pm 0,46$
Polifenóis	183,81 $\pm 0,13$	69,63 $\pm 6,41$	222,53 $\pm 27,82$	ND	ND

ND: Não detectado.

### 3.2 Resultados do *Screening* da Atividade Antifúngica

Pelo método da microdiluição, tanto a amostra EXT quanto as frações purificadas apresentaram inibição das diferentes espécies de *Candida*. O EXT e as frações purificadas apresentaram inibição do crescimento de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. De modo contrário, somente a F<sub>ALC</sub> não inibiu o crescimento de *C. albicans*. Por outro lado, a F<sub>POLIF</sub> inibiu o crescimento de *C. krusei*, espécie que possui intrinsecamente gene de resistência ao fluconazol (Denning *et al.*, 1997; Andreu *et al.*, 2007). Cabe ressaltar que nesse ensaio, além do fluconazol, a cepa em questão demonstrou resistência à anfotericina B. *C. tropicalis* demonstrou ser resistente frente ao EXT e frações testadas.

### 3.3 Determinação dos valores da Concentração Inibitória Mínima

Foram consideradas para esse ensaio as espécies de *Candida* que se mostraram sensíveis à ação do extrato bruto e de frações purificadas no teste de *screening* de atividade antifúngica. Os resultados de determinação da CIM estão ilustrados na tabela 2.

Nesta tabela se observa que a F<sub>POLIF</sub> apresentou a maior atividade antifúngica quando comparada às demais frações e ao extrato bruto, tendo em vista os menores valores de CIM obtidos para essa fração. No entanto, cabe ressaltar a atividade antifúngica observada para a F<sub>AQ</sub> frente a todas as espécies de *Candida* testadas, a exceção de *C. krusei*, que demonstrou ser resistente a essa fração. Além de apresentarem atividade antifúngica separadamente, as frações F<sub>AQ</sub> e F<sub>POLIF</sub> também mostraram ser ativas quando testadas em associação.

O efeito antifúngico evidenciado para o EXT foi menor quando comparado ao das frações isoladas, denotando a importância e efetividade dos processos de purificação empregados.

**Tabela 2**– Perfil de sensibilidade de isolados de *Candida spp.* pelo método de microdiluição em caldo frente ao extrato e frações purificadas da *U. tomentosa*.

	EXT (µg/mL)	F <sub>AQ</sub> (µg/mL)	F <sub>POLIF</sub> (µg/mL)	F <sub>AQ</sub> + F <sub>POLIF</sub> (µg/mL)	F <sub>ALC</sub> (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	500 - R	125 - R	15,62 – 125	62,5 - 500	NT
<i>C. glabrata</i>	250 - R	125 - 125	7,81 – 15,62	1,95 – 62,5	500 - R
<i>C. krusei</i>	NT	R - R	15,62 – 62,5	31,25 - 250	NT
<i>C. parapsilosis</i>	62,5 - 500	15,62 - R	7,81 – 15,62	31,25 – 62,5	500 - R

R – Resistência à substância; NT – Não foi testado.

No presente trabalho a identificação da estrutura química dos polifenóis presentes no extrato e frações enriquecidas de *U. tomentosa*, não foram realizados. No entanto, existem relatos para a espécie da presença abundante de taninos condensados, proantocianidinas e suas unidades monoméricas catequina e epicatequina, compondo cerca de 20% do conteúdo das cascas e talos de *U. tomentosa* (Sandoval *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2004; Heitzman *et al.*, 2005). Além disso, recentemente evidenciou-se a presença de derivados cafeoilquínicos como ácido cafêico e clorogênico, e de flavonóides como a rutina em extrato hidoetanólico a 40% (v/v) obtido a partir das cascas de *U. tomentosa* (Pavei *et al.*, 2010b).

Taninos condensados são conhecidos por apresentar diferentes atividades antimicrobianas (Holetz *et al.*, 2005; Sanches *et al.*, 2005). Estudos

indicam que o grau de polimerização e hidroxilação exercem influência sobre a atividade biológica (Scalbert, 1991, Field e Lettinga, 1992). A atividade antifúngica frente a *C. albicans* foi observada em diferentes subfrações de taninos de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e, especificamente, a atividade preponderante foi atribuída à subfração de proantocianidina trihidroxilada no anel B (Ishida *et al.*, 2006).

Também foi reportada a capacidade do extrato das sementes de *Vitis vinifera* em inibir o crescimento de *C. albicans* (Han, 2003). Para *Punica granatum* foi observada atividade frente a *C. albicans* e *C. parapsilosis*, atividade essa atribuída a presença de polifenóis e taninos, predominantes no extrato dessa espécie (Endo *et al.*, 2010). O mecanismo de ação específico de atividade antifúngica dos taninos frente às espécies de *Candida* não está completamente esclarecido, contudo estudos sugerem que pode haver uma ação sobre a membrana celular, uma vez que esses compostos interagem com proteínas (Haslan 1996; Vasconcelos *et al.*, 2003). Outros mecanismos propostos incluem a inibição extracelular de enzimas, privação de substratos necessários para o seu crescimento e, ainda, ação direta na levedura através da inibição da fosforilação oxidativa (Scalbert, 1991).

No contexto do processo patogênico da candidíase, cabe salientar o fato de a atividade anti-candida relatada para *Vitis vinifera* (Han, 2003) ter sido associada à presença abundante de polifenóis, como as procianidinas, que estimulam a produção de Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) derivado de células Th1 (Nair *et al.*, 2002). Esses polifenóis parecem favorecer a inibição de *C. albicans* (Marodi *et al.*, 1994; Donini *et al.*, 2007) que, no caso específico de estudos em camundongos, é complementada por uma indução imunológica, associada a esse grupo de substâncias presentes em *Vitis vinifera* (Yongmoon Han, 2007).

A atividade antifúngica de triterpenos de diversas espécies vegetais tem sido amplamente relatada (Oleszek *et al.*, 1990; Hostettman and Marston, 1995; Osbourn *et al.*, 1996; Sindambiwe *et al.*, 1998). Os resultados obtidos no presente trabalho não só confirmam achados anteriores, como também introduzem a espécie e o grupo de terpenos derivados do ácido quinóico como agentes antifúngicos potenciais.

Estudos publicados relacionam a estrutura dos triterpenos com sua atividade antifúngica, fato que possibilitaria a identificação do mecanismo de

ação. Mshvildadze *et al.*, (2000) relata que triterpenos podem estar envolvidos em mecanismos de ação que implicam em dano na membrana dos fungos, conduzindo a vazamento de material celular e lise celular. Este modo de atuação tem sido também endossado a diversos triterpenos, frente a uma variedade de fungos, incluindo *C. albicans* (Lalitha e Venkataraman, 1991; Polacheck *et al.*, 1991; Woldemichael e Wink, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Chapagain *et al.*, (2007), testou a atividade de extratos ricos em triterpenos de algumas espécies vegetais frente a diferentes fungos, evidenciando que um extrato oriundo de uma mesma espécie apresentou atividades diferentes contra fungos diferentes. Esta atividade diferenciada parece estar relacionada com as diferenças na composição dos esteróis das células dos fungos, assim como com as diferenças de composição dos triterpenos no extrato. A associação de moléculas de triterpenos com o esterol presente nas células de fungos já foi reportado na literatura (Morissey e Osbourn, 1999).

#### **3.4 Avaliação do efeito sinérgico das frações de *U. tomentosa* e fluconazol**

Não foi evidenciado efeito sinérgico entre as frações de polifenóis e triterpenos, já que a fração de polifenóis isoladamente apresentou menor CIM do que quando associado aos triterpenos (Tabela 2).

No presente estudo foram realizados ensaios preliminares da avaliação do efeito sinérgico entre as frações de *U. tomentosa* e fluconazol, sendo esse um dos fármacos mais empregados no tratamento dos diferentes tipos de candidíase, especialmente em casos de candidíase vulvovaginal, esofágica ou oral (Endo *et al.*, 2010).

Na determinação da CIM para fluconazol, foram considerados sensíveis os microrganismos com  $CIM \leq 8 \mu\text{g/ml}$ , sensíveis dose-dependente nas concentrações de 16 a 32  $\mu\text{g/ml}$ , e resistentes nas concentrações  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  (CLSI M27-A3, 2008) Para a realização do ensaio de sinergismo a amostra de fluconazol foi preparada na concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$ .

De acordo com os resultados da Tabela 3, pode-se ressaltar os resultados do sinergismo para a utilização conjunta de fluconazol e da fração

de polifenóis (FLU+F<sub>POLIF</sub>), bem como da utilização conjunta de fluconazol, fração de polifenóis e fração de triterpenos (FLU+F<sub>POLIF</sub>+F<sub>FAQ</sub>) frente à *C. krusei*. A fração de polifenóis utilizada isoladamente promoveu inibição em concentração de 62,5 µg/mL sendo essa cepa resistente ao fluconazol. Quando da associação (FLU+F<sub>POLIF</sub>) a inibição do crescimento de *C. krusei* foi obtida com concentração de 0,98 µg/mL. O mesmo valor de CIM foi obtido para a associação de FLU+F<sub>POLIF</sub>+F<sub>FAQ</sub>; nesse caso a associação de F<sub>FAQ</sub> e F<sub>POLIF</sub> apresentou inibição na concentração de 250 µg/mL para a mesma cepa de *C. krusei*.

**Tabela 3** - Resultado da avaliação de sinergismo com as frações de *U.tomentosa* e fluconazol

(µg/mL)	FLU+F <sub>POLIF</sub>	FLU+F <sub>FAQ</sub>	FLU+F <sub>POLIF</sub> +F <sub>FAQ</sub>
<i>C. albicans</i>	15,62	R	R
<i>C. glabrata</i>	R	62,5	7,81
<i>C. krusei</i>	0,98	NT	0,98
<i>C. parapsilosis</i>	0,98	15,62	3,90

R – Resistência à substância; NT – Não foi testado

A utilização conjunta de FLU e da F<sub>POLIF</sub> não inibiu o crescimento de *C. glabrata*, espécie que também apresenta gene de resistência ao fluconazol (Yoo *et al.*, 2010). Também merecem atenção os resultados procedentes da associação da F<sub>FAQ</sub>, FLU mais a F<sub>POLIF</sub>. Essa associação promoveu uma redução da CIM para 7,81 µg/mL, quando comparada com o valor de 62,5 µg/mL observado para a associação das F<sub>POLIF</sub> e de F<sub>FAQ</sub>.

Para *C. parapsilosis* foi observado efeito sinérgico quando FLU e a F<sub>POLIF</sub> foram testados em associação. Quando utilizada separadamente, a F<sub>POLIF</sub> apresentou valores de CIM entre 7,82 e 15,62 µg/mL, para as cepas testadas. No entanto, quando a F<sub>POLIF</sub> é testada conjuntamente com o FLU o valor de CIM determinado foi de apenas 0,98 µg/mL. Em relação a *C. albicans*, não pôde ser confirmado sinergismo para a associação de fluconazol e da fração de polifenóis, se considerados dados da literatura (Sutton *et al.*, 1998).

A importância de se evidenciar efeito sinérgico entre antimicóticos de ampla utilização e frações obtidas de material vegetal com constituição química

bem definida visa aumentar o espectro de ação dos antimicóticos, além de melhorar sua tolerabilidade com a diminuição de possíveis efeitos adversos (Eliopoulos e Moellering, 1996a; Lewis e Kontoyiannis, 2001). Nesse sentido, as frações purificadas de *U. tomentosa* mostraram resultados promissores em relação ao potencial antifúngico, demonstrando efeito sinérgico com fluconazol, em especial a F<sub>POLIF</sub> e, em menor escala a F<sub>AQ</sub>. Estudos complementares de identificação e purificação dos constituintes nas frações de interesse encontram-se em andamento.

#### 4. Conclusões e perspectivas

Foi evidenciada atividade antifúngica para o extrato e frações de *U. tomentosa* frente a leveduras patogênicas. Resultados relevantes foram obtidos para a fração de polifenóis, onde foi obtida uma faixa de inibição entre 7,81 e 15,62 µg/mL frente a *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, sendo a fração de triterpenos também ativa, embora em escala menor. Na avaliação do sinergismo, resultados de inibição de crescimento foram obtidos frente à *C. krusei*, resultando numa inibição de 0,98 µg/mL na utilização conjunta tanto de fluconazol e polifenóis como na associação de fluconazol, polifenóis e triterpenos, principalmente por tratar-se de espécie naturalmente resistente ao fluconazol. Estudos complementares de identificação e purificação dos constituintes nas frações de interesse, a fim de verificar a quais polifenóis e triterpenos pode-se atribuir a atividade antifúngica, serão realizados no futuro. Pretende-se ainda fazer um ensaio bioguiado para avaliação do sinergismo com outros antifúngicos comerciais, em especial a anfotericina-B, para diversas concentrações de cada uma das partes.

Deve-se também investigar o mecanismo de ação das diversas amostras contra as leveduras.

Ainda se pretende fazer um ensaio em camundongos para análise de viabilidade do uso de frações ativas *in vivo* e para ensaios toxicológicos.

## GLOSSÁRIO

**Candidíase** - A candidíase é uma infecção primária ou secundária causada por fungos do gênero *Candida*. As manifestações clínicas desta infecção podem ser agudas, subagudas ou crônicas a episódicas, podendo envolver áreas localizadas ou constituir infecções sistêmicas.

**Escala Mac-Farland** - método de quantificação de microorganismos através de turbidez. A escala é preparada com ácido sulfúrico e cloreto de bário em diversas concentrações, que reagem formando cloreto de bário obtendo diversos graus de turbidez. A concentração aproximada de microorganismos é dada conforme a leitura de absorbância realizada.

**Liofilização** - É um processo de desidratação usado para preservar princípios ativos, bactérias, etc, onde estes são congelados e a água é retirada, por sublimação, sem que passe pelo estado líquido.

**Fosforilação Oxidativa** - É uma via metabólica que utiliza energia libertada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir trifosfato de adenosina (ATP). O processo refere-se à fosforilação do ADP em ATP, utilizando para isso a energia libertada nas reações de oxidação-redução.

**Imunodeprimidos** - Aquele está diante de uma condição clínica que reduz a imunidade, como a AIDS.

**Imunossuprimidos** - Aquele que está usando medicação imunossupressora, que reduzem a imunidade.

**Interferon-  $\gamma$**  – Proteína naturalmente produzida pelos linfócitos T, tem a função de ativar o sistema imunológico.

**Reagente de Folin- Ciocalteu** - É uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

**Polivinil-polipirrolidona** - Polímero capaz de interações intermoleculares, mesmo em soluções diluídas a diferentes temperaturas. Também forma ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Quando seco, é um pó levemente floculento, o qual absorve até 18% de seu peso em umidade do ar. Em solução, apresenta excelentes propriedades de umidificação e facilmente forma filmes (películas). Isto o faz bom como revestimento ou aditivo a revestimentos.

**Resina de troca-iônica** - São produtos sintéticos que, se colocados na água, poderão liberar íons sódio ou hidrogênio (resinas catiônicas) ou hidroxila (resinas aniônicas) e captar desta mesma água, respectivamente, cátions e ânions, responsáveis por seu teor de sólidos dissolvidos, indesejáveis a muitos processos industriais.

**Resina fortemente aniônica** - Todas as resinas aniônicas fortemente básicas removem ânions fortes e fracos, tais como cloretos, sulfatos, nitratos, bicarbonatos e silicatos.

## REFERÊNCIAS

- Aguilar, J.L., Rojas, P., Adolfo, M., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., Klaas, C., Merford, I., 2002. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 81, 271-276.
- Andreu, C.M.F., Machín, G.M., Zaragoza, M.T.I., Lancha, M.R.P., Sánchez, A.A., Galloso, M.B., 2007. Sensibilidade in vitro de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 59, 2.
- Aquino, R., Vincenzo, F., Francesco, S., 1990. Plant Metabolites. structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products*. 52, 679-685.
- Aquino, R., Vincenzo, F., Francesco, S., 1991. Plant Metabolites. New compounds and anti inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural Products*, 54, 453-459
- Aquino, R.; De Tommasi, N.; De Simone, F.; Pizza, C., 1997. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*. 45, 1035-1040.
- Bishnu P., Chapagain, Wiesman, Z., Tsrer L., 2007. In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26,109–115
- Borré, G. L., 2010. Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Dissertação de Mestrado.
- Denning D.W., Baily G.G., Hood S.V., 1997. Azole resistance in *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 16, 261-80.

- Donini, M., Zenaro, E., Tamassia, N., Dusi, S., 2007. NADPH oxidase of human dendritic cells: role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *European Journal of Immunology*. 37, 1194–1203.
- Eggimann P., Garbino J., Pittet D., 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infectious Disease* 3, 685—702.
- Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., 1996. Antifungal drugs: mechanism of action. Drug resistance, susceptibility testing and assays of activity in biologic fluids. In: Lorian, V. (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, fourth ed. Willians and Wilkins, Baltimore, pp. 177e211.
- Endo, E.H., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*. 161, 534-540.
- Field J.A., Lettinga G., 1992. Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In: Hemingway, R.W., Laks P.E., (Eds.), *Plant Polyphenols.*, New York: Plenum Press, pp 673–89.
- Gonzales, G. F., Valerio Jr., L. G., 2006. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 6, 429–444.
- Han, Y., 2003. Grape seed extract protects mice against disseminated candidiasis. *Journal of Natural Products*. 9, 60–63.
- Haslan, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs. Possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 59, 505 e 515.
- Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. 66, 5-29.

- Hemingway, S.R., Phillipson, J.D., 1974. Alkaloids from South American species of *Uncaria* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 26, 113.
- Holetz F.,B, Ueda-Nakamura T., Dias Filho B.P., 2005. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100, 397–401.
- Kaiser, S. Influência de fatores tecnológicos sobre a isomerização de alcalóides de *Uncaria tomentosa* e atividades biológicas relevantes. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Em andamento. Dissertação de Mestrado.
- Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M.P., Teppner, H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Wild). Ethnomedicinal uses and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 23-34.
- Lalitha, T., Venkataraman, L.V., 1991. Antifungal activity and mode of action of saponins from *Madhuca butyracea* Macb. *Indian Journal of Experimental Biology* 29, 558–562.
- Laus, G., Brössner, D., Keplinger K., 1997. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*. 45, 855-860.
- Lemaire, I., Assinewe, V., Cano, P., Awang, D.V.C., Arnason, J.T., 1999. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato), *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 109-115.
- Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P., 2001. Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy*. 21, 149 e 164.
- Marodi, L., Kaposzta, R., Campbell, D.E., Polin, R.A., Csongor, J., Johnston Jr., R.B., 1994. Candidacidal mechanisms in the human neonate. Impaired IFN-gamma activation of macrophages in newborn infants. *Journal of Immunology*. 153, 5643–5649.

- Méan M., Marchetti O., Calandra T., 2008. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Critical Care*. 12, 204.
- Mshvildadze, V., Favel, A., Delmas, F., Elias, R., Faure, R., Decanosidze, Q., Kemertelidze, E., Balansard, G., 2000. Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie* 55, 325–326.
- Nair, N., Mahajan, S., Chawda, R., Kandaswami, C., Shanahan, T.C., Schwartz, S.A., 2002. Grape seed extract activates Th1 cells in vitro. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9, 470–476.
- Nguyen M.,H., Peacock Jr J.E., Morris A.J., Tanner D.C., Nguyen M.L., Snyderman D.R., 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *American Journal of Medicine*. 100,617—23.
- Paiva, L.C.A., Ribeiro, R.A., Pereira, I.V., Oliveira, N.M.C., 2009. Avaliação Clínica e Laboratorial do Gel de *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(2A), 423-428.
- Pavei, C., 2010a. Obtenção e avaliação de frações purificadas e farmacologicamente ativas presentes em *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC. (unha-de-gato). Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Tese de Doutorado.
- Pavei, C., Kaiser, S., Borré, G.L., Ortega, G.G., 2010b. Validation of a LC Method for Polyphenols Assay in *Cat's Claw* (*Uncaria tomentosa*). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 33, 17.
- Pilarski, R., Zielinski, H., Ciesiolka, D., Gulewicz, K., 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 18–23.
- Reinhard, K.H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's Claw, Uña de Gato, or Saventaro. *The Journal of Alternative Complementary Medicine*. 5, 143-151.

- Reis, S.R.I.N., Valente, L.M.M., Sampaio, A.L., Siani, A.C., Gandini M., Azeredo E.L., Mazzei, J.L., D'avila, L.A., Kubelka, C.F., Henriques M.G.M., 2008. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International Immunopharmacology*. 8, 468-476.
- Saghrouni, F., Bougmiza, I., Abdeljelil, J.B., Yacoub, A., Khammari, I., Fathallah, A., Mtiraoui, A., Said, M.B., 2011. Epidemiological trends in invasive candidiasis: Results from a 15-year study in Sousse region, Tunisia. *Journal de Mycologie Médicale*. 21, 123—129
- Sanches A.C.C., Lopes G.C., Nakamura C.V., 2005. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41, 100–7.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial proprieties of tannins. *Phytochemistry*. 30, 3875–83.
- Sutton, D.A, Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., 1998. Clinically significant fungi. Baltimore, Williams and Wilkins 238-239.
- Vasconcelos, L.C.S., Sampaio, M.C.C., Sampaio, F.C., Higino, J.S., 2003. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 46, 192 e 196.
- Yongmoon H., 2007. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 14, 733-738.
- Yoo, J., Choi, C.W., Lee, K.M., Lee, Y.S., 2010. Gene Expression and Identification Related to Fluconazole Resistance of *Candida glabrata* Strains. *Public Health and Research Perspectives*. 36-41.

## ANEXO A

A tabela que segue apresenta dados referenciais dos CIMs do fluconazol frente a diversas leveduras de interesse deste trabalho. Serve para comparação de valores para a avaliação do sinergismo das amostras de *U. tomentosa* com o fluconazol.

**Valores de CIM para fluconazol frente a leveduras testadas.**

	<b>Total de cepas testadas</b>	<b>CIM fluconazol (µg/mL)</b>	<b>Nº de cepas que apresentaram a CIM</b>
<i>C. albicans</i>	538	0,5	119
<i>C. glabrata</i>	337	4,0 8,0	100 72
<i>C. parapsilosis</i>	367	153	1,0
<i>C. krusei</i>	88	32 64	41 39

Sutton *et al.*, 1998.