

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Acca sellowiana*

GABRIELLA DA ROSA MONTE MACHADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Kellen Cristhinia Borges de Souza

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Acca sellowiana*

GABRIELLA DA ROSA MONTE MACHADO
Farmacêutica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Fevereiro de 2015

GABRIELLA DA ROSA MONTE MACHADO
FARMACÉUTICA
UFSM

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

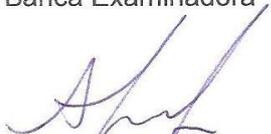
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

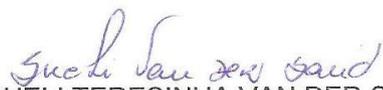
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

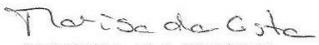
Porto Alegre (RS), Brasil

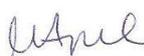
Aprovada em: 25/02/2015
Pela Banca Examinadora

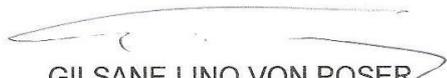

ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA
Orientador-UFRGS

Homologado em: 12/08/2015
Por:


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA


MARISA DA COSTA
UFRGS


MIRIAM ANDERS APEL
UFRGS


GILSANE LINO VON POSER
UFRGS


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

da Rosa Monte Machado, Gabriella
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ACCA
SELLOWIANA / Gabriella da Rosa Monte Machado. --
2015.
108 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.
Coorientadora: Kellen Cristhina Borges de Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Candida não-albicans. 2. Acca sellowiana. 3.
resistência antifúngica. 4. fluconazol. 5.
myrtaceae. I. Meneghello Fuentefria, Alexandre ,
orient. II. Borges de Souza, Kellen Cristhina,
coorient. III. Título.

“O Homem é do tamanho do seu sonho”.

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais,
Diva e Naisson, que sempre
foram incansáveis para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me direcionado em minhas escolhas que sempre foram difíceis de serem feitas e de ter me colocado onde estou hoje.

Aos meus pais Diva da Rosa Monte Machado e Naisson Monte Machado, pelo apoio incondicional e por serem responsáveis pela minha educação pessoal e profissional para que eu conseguisse chegar até aqui, sempre investindo em minha vida acadêmica sem medirem esforços e ultrapassando limites. Nada pode explicar o quanto eu sou grata a vocês.

Ao meu namorado Daniel Rossi pelo companheirismo, amor, lealdade e paciência, principalmente nesses últimos três meses, você foi essencial. E pelas suas sugestões e ajudas na preparação da Dissertação.

Ao meu Avô, Wilson Pereira Machado, que sempre ensinou a todos que a educação e o conhecimento são as nossas maiores virtudes. Onde estiver, sei que hoje está muito feliz.

À minha prima Viviane Rubert, por ser parte da construção dessa realização. Muito obrigada por tudo nesses três anos de convívio diário.

Ao professor Alexandre Fuentefria pela oportunidade de ser sua orientada e confiança depositada em mim antes e durante todo o desenvolvimento do projeto, pelas sugestões, ajudas, conselhos e apoio.

À professora Kellen de Souza, que apesar das dificuldades enfrentadas para realização de algumas metodologias, cedia seu curto tempo disponível para me ajudar e estar presente no que era necessário.

Às colegas e amigas do laboratório de Micologia, especialmente a Bruna Pippi, Vanessa Bergamo e a Daiane Dalla Lana, que desde o início foram receptivas e dispostas a ajudar no que eu precisasse. Desde a disponibilidade para explicações de ensaios e resolução de problemas, até a parceria, amizade, companhia de bancada, risadas, e cafezinhos. Às gurias do PPGCF que contribuem com seus conhecimentos em nosso laboratório e tornam o dia a dia de trabalho mais agradável.

Às amigas de longa data, pelo carinho, amizade, confiança e apoio nas horas boas e ruins. Mesmo longe, se fazem presentes neste momento.

Agradeço à banca, composta pelas professoras Marisa da Costa, Mirian Apel e Gilsane von Poser, por estarem presentes neste dia contribuindo com o aperfeiçoamento deste trabalho.

Muito obrigada a todos vocês.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *ACCA SELLOWIANA*.¹

Autora: Gabriella da Rosa Monte Machado
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentesfria
Co-orientadora: Kellen Cristhinia Borges de Souza

RESUMO

Infecções fúngicas causadas por leveduras oportunistas de *Candida* não – *albicans* (CNA) têm aumentado drasticamente nas últimas décadas, podendo estar relacionadas com o elevado número de pacientes imunocomprometidos, mais susceptíveis a essas infecções. CNA possuem maior resistência aos antifúngicos tradicionais como o fluconazol (FLZ), fármaco de escolha para o tratamento de infecções por *Candida* spp. A resistência antifúngica conduz a falhas na terapia clínica podendo levar ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade. Associações entre fármacos e substâncias naturais pode ser uma alternativa viável para superar a resistência antifúngica em CNA. *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret, é uma goiabeira pertencente à família Myrtaceae, possuindo diversas atividades biológicas comprovadas. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antifúngica de frações ativas obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de folhas de *A. sellowiana* frente a isolados resistentes de CNA. Como resultado, isolados de *Candida glabrata* foram os mais susceptíveis as frações ativas quando comparados aos demais isolados. As frações ativas F1, F2 e F3 apresentaram melhor atividade antifúngica comparadas às demais, sendo a fração ativa F2, a mais eficaz. Foi demonstrado efeito sinérgico em 80% dos isolados de *C. glabrata* entre a combinação de FLZ e a fração ativa F2. Na determinação de compostos fenólicos foi identificada a presença de catequina nas frações ativas. A análise dos espectros no UV dos demais picos cromatográficos encontrados nessas frações indica a presença de flavonoides e compostos fenólicos, correlacionando a possível atividade antifúngica dessas frações com a combinação dessas substâncias. O ensaio do sorbitol indicou que a ação da fração ativa F2 ocorre na parede celular das leveduras, corroborando com o dano estrutural observado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (108 p.) Fevereiro, 2015.

DETERMINATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *ACCA SELLOWIANA*¹.

Authoress: Gabriella da Rosa Monte Machado
Supervisor: Alexandre Meneghello Fuentefria
Co-supervisor: Kellen Cristhinia Borges de Souza

ABSTRACT

Fungal infections caused by opportunistic yeast non - *albicans Candida* (NAC) have dramatically increased in recent decades and could be related to the high number of immunocompromised patients. NAC have greater resistance to traditional antifungal agents such as fluconazole (FLZ), the drug of choice for the treatment of infections caused by *Candida* spp. The antifungal resistance leads to failures in clinical therapy and may cause an increase in morbidity and mortality rates. Associations between drugs and natural substances can be a feasible alternative to overcome antifungal resistance in NAC. *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret is a guava tree belonging to the Myrtaceae and has several proven biological activities. Thus, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of fractions obtained from the freeze-dried aqueous extract of leaves of *A. sellowiana* against resistant isolates of NAC. As a result, *Candida glabrata* isolates were the most susceptible to active fractions when compared to the others isolates. The F1, F2 and F3 active fractions showed the better antifungal activity and the F2 active fraction was the most effective. Synergistic effect of FLZ with F2 active fraction was demonstrated in 80% of *C. glabrata* isolates. The UV spectra analysis of the chromatographic peaks found in these other fractions indicate the presence of flavonoids and phenolic compounds, correlating the antifungal activity of these fractions with the combination of these substances. The sorbitol test indicates that the action of F2 active fraction possibly occurs in the cell wall of yeasts, confirming structural damage observed by scanning electron microscopy (SEM).

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (108 p.) February, 2015.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral	4
1.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 O gênero <i>Candida</i>	5
2.2 Leveduras emergentes: <i>Candida</i> - não - <i>albicans</i>	9
2.3 Terapia antifúngica para o tratamento de candidíases e candidemias	12
2.3.1 Terapia para candidíase superficial e cutânea	15
2.3.2 Terapia para candidíase mucocutânea	15
2.3.3 Terapia para candidíase invasiva	17
2.4 Resistência aos antifúngicos e mecanismos de resistência em <i>Candida</i> spp.	18
2.4.1 Aspectos gerais	18
2.4.2 Mecanismos de resistência das espécies de <i>Candida</i> aos fármacos azóis	20
2.4.3 Mecanismos de resistência das espécies de <i>Candida</i> aos demais fármacos antifúngicos	22
2.5 Terapia antifúngica mediante a associação de fármacos	23
2.6 Alternativas para terapia antifúngica utilizando substâncias de origem vegetal.....	25
2.6.1 Aspectos gerais	25
2.6.2 Família Myrtaceae	29
2.6.3 <i>Acca sellowiana</i>	30
3. METODOLOGIA	33

3.1 Locais da realização da pesquisa.....	33
3.2 Seleção e coleta da amostra para realização da pesquisa	34
3.3 Seleção dos micro-organismos de interesse	34
3.4 Obtenção das frações ativas a partir do extrato liofilizado das folhas de <i>A. sellowiana</i>	35
3.5 Análise das frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de <i>A. sellowiana</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	36
3.6 Análise de compostos fenólicos em frações ativas de <i>A. sellowiana</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - PDA)	37
3.6.1 Condições cromatográficas	37
3.6.2 Preparação das substâncias referências e das frações ativas.....	37
3.6.3 Preparação da curva padrão e amostras	38
3.7 Avaliação da atividade antifúngica - <i>Screening</i>	39
3.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações ativas de <i>A. sellowiana</i>	39
3.9 Preparo das soluções de fármacos antifúngicos utilizados.....	40
3.10 Ensaio de sinergismo - método de <i>checkerboard</i>	41
3.11 Ensaio de proteção do sorbitol	43
3.12 Efeito sobre o ergosterol exógeno	44
3.13 Microscopia eletrônica de varredura	45
<u>4. RESULTADOS</u>	45
4.1 Ensaio de Susceptibilidade Antifúngica.....	46
4.2 Análise das frações ativas de <i>A. sellowiana</i> por (CCD).....	50
4.3 Análise das frações ativas de <i>A. sellowiana</i> por CLAE.....	50
4.3.1 Curva padrão da catequina e sua concentração nas frações ativas	53
4.4 Avaliação de possível efeito sinérgico entre a fração ativa F2 com FLZ e AND através do método de <i>checkerboard</i>	54
4.4.1 Interação da fração ativa F2 com o FLZ	54
4.4.2 Interação da fração ativa F2 com a AND	57
4.5 Avaliação do efeito de proteção da parede celular pelo sorbitol.	59
4.6 Efeito sobre o Ergosterol exógeno na membrana celular.....	60

4.7 Avaliação de dano celular através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
<u>5. DISCUSSÃO</u>	<u>64</u>
<u>6. CONCLUSÕES</u>	<u>75</u>
<u>7. PERSPECTIVAS</u>	<u>77</u>
<u>8. REFERÊNCIAS</u>	<u>79</u>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: <i>Screening</i> da atividade antifúngica de frações obtidas do extrato aquoso liofilizado de <i>A. sellowiana</i> frente a isolados resistentes de <i>Candida</i> não – <i>albicans</i>	46
TABELA 2: Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) expressa em µg/mL de frações ativas de <i>A. sellowiana</i> frente a isolados resistentes de <i>Candida</i> não - <i>albicans</i>	48
TABELA 3: Valores de CIM (µg/mL) em 24 e 48 h para as frações ativas F1, F2 e F3, frente a isolados de <i>C. glabrata</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol. ...	49
TABELA 4: Concentração de Catequina presente nas frações ativas F1, F2, e F3 após obtenção da curva padrão de catequina e análise de regressão.	53
TABELA 5: Avaliação da interação entre a fração ativa F2 e o fluconazol (FLZ) contra isolados de <i>C. glabrata</i> através do método de <i>checkerboard</i>	55
TABELA 6: Avaliação da interação entre a fração ativa F2 e a AND (anidulafungina) contra isolados de <i>C. glabrata</i> através do método de <i>checkerboard</i>	58
TABELA 7: Valores da CIM (µg/mL) referentes à fração ativa F2 e anidulafungina (AND) para isolados de <i>C. glabrata</i> na presença e na ausência de sorbitol após sete dias.	59
TABELA 8: Avaliação da CIM (µg/mL) para a fração ativa F2 em isolados de <i>C. glabrata</i> na ausência e na presença de Ergosterol exógeno.	61
TABELA 9: Avaliação da CIM (µg/mL) para a anfotericina B em isolados de <i>C. glabrata</i> na ausência e na presença de Ergosterol exógeno.	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Cromatograma e espectro de absorção Substância de Referência Catequina por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L. Tempo de retenção da Catequina: 19.744. 51

FIGURA 2: Cromatograma e espectros de absorção dos picos majoritários (picos 1, 2 e 3) detectados na fração F1 (1000 μ g/mL), por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L. Pico 1: catequina (tr:19,699)..... 51

FIGURA 3: Cromatograma e espectros de absorção dos picos majoritários (picos 1 e 2) detectados na fração F2 (1000 μ g/mL), por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L. Pico catequina (tr: 19.073)..... 52

FIGURA 4: Cromatograma e espectros de absorção dos picos majoritários (picos 1 e 2) detectados na fração F3 (1000 μ g/mL), por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L. Pico da catequina (tr: 19.764)..... 52

FIGURA 5: Curva padrão de catequina 53

FIGURA 6: Percentagem de dano celular encontrada em quatro combinações mais eficazes entre a interação da fração ativa F2 com o fluconazol (F2 + FLZ). Eixo horizontal: Percentagem de dano celular da fração ativa F2 quando avaliada isoladamente, em duas concentrações inibitórias mínimas diferentes. Eixo de profundidade: Percentagem de dano celular do fluconazol (FLZ) quando avaliada isoladamente em duas concentrações inibitórias mínimas diferentes. Eixo vertical: Percentagem de dano celular resultante da interação entre a fração ativa F2 e o fluconazol (FLZ) em concentrações inibitórias mínimas diferentes, representando as quatro combinações mais eficazes entre a fração ativa F2 e o FLZ. a) CG RL 02 S; b) CG RL 03 S; c) CG RL 12 m; d) CG RL12 S; e) CG RL 22; f) CG RL 24; g) CG RL 34 m; h) CG RL 34 S; i) CG RL 37 m; j) CG RL 37 S. 57

FIGURA 7: Fotomicrografias referentes à visualização dos isolados de *C. glabrata* em microscópio eletrônico de varredura (MEV). a) CG RL 02S (5000 x); b) CG RL 02S (10000 x); c) CG RL 34m (15000 x); d) CG RL 12S (10000 x); e) CG RL 24 (5500 x); f) ATCC 40039 (4500 x); g) CG RL 37m (10000 x); h) Cepa Controle ATCC 40039 isenta de F2 (10000 x). Corrente elétrica utilizada: 5kv. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AND: anidulafungina
ANF: anfotericina B
CAN: *Candida não-albicans*
CCD: cromatografia em camada delgada
CDR: gene *Candida drug resistance*
CIF: concentração inibitória fracionada
CIM: concentração inibitória mínima
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxiribonucleico
FLZ: fluconazol
ICIF: índice de concentração inibitória fracionada
MDR1: gene *multiple drug resistance*
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS: 3- (*n-morpholino*)-*propanesulfonic acid*
MTT: 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil-tetrazólio brometo
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
ASD: ágar sabouraud dextrose
SR: substância de referência
UTI: Unidade de Terapia Intensiva
5-FC: flucitosina

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas vêm emergindo processos infecciosos causados por micro-organismos que antes eram considerados saprófitos ou apenas constituintes da microbiota residente do homem e dos animais. Essa incidência tem se tornado um problema de saúde pública global, obrigando as autoridades da área da saúde a alterarem suas estratégias terapêuticas, principalmente nas infecções fúngicas sistêmicas. Como exemplos desses micro-organismos estão as leveduras do gênero *Candida*, com ênfase nas espécies de *Candida* não - *albicans* (CNA). Essas leveduras, também são conhecidas como leveduras emergentes oportunistas, visto que, na sua maioria faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de humanos. Essas leveduras ganharam importância clínica nos últimos anos principalmente pela sua crescente incidência nos casos de candidíases e candidemias. Indivíduos imunocomprometidos é o principal alvo dessas infecções, devido ao oportunismo desses patógenos na depressão do sistema imune ou quando na presença de doenças crônicas relacionadas. Dessa forma, pacientes imunocomprometidos como HIV-positivos, pacientes transplantados, diabéticos e idosos, são mais propensos a desenvolverem essas infecções.

Uma das maiores preocupações envolvidas com as CNA, é o fato de possuírem maior resistência aos agentes antifúngicos existentes comparadas à *Candida albicans*. Tal fato conduz a uma maior dificuldade de estabelecer um tratamento correto nas infecções causadas por essas leveduras, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade principalmente em indivíduos imunodeprimidos. O uso indiscriminado pela população desses fármacos

antifúngicos como tratamento profilático ou por longos períodos de tempo acarretam em falhas no tratamento clínico. Conseqüentemente, isso propicia a seleção de isolados de CNA resistentes a certos antifúngicos como o fluconazol, fármaco de escolha no tratamento dessas infecções leveduriformes oportunistas. Além de resistência antifúngica, longo tratamento com antifúngicos acarretam em altos custos para os pacientes e diversos efeitos adversos, como a sobrecarga renal e hepatopatias diversas. Dentro desse contexto, pesquisadores do mundo inteiro prospectam novas substâncias que apresentem eficácia, segurança e, que consigam burlar a resistência encontrada em leveduras emergentes de *Candida*.

Considerando o cenário exposto e a necessidade imediata de uma alternativa resolutive, várias estratégias de tratamento têm sido realizadas visando superar essa resistência antifúngica e promover um tratamento seguro ao paciente. Como exemplo, associações de antimicóticos com mecanismos de ação distintos, ou antifúngico associado a substâncias não antifúngicas estão sendo constantemente utilizadas na prática clínica. Além de superar a resistência, esse manejo terapêutico aumenta a eficácia do tratamento e ao mesmo tempo diminui a dose administrada de cada fármaco, reduzindo seus efeitos adversos e a chance da tolerância farmacológica.

Outra emergente alternativa para o tratamento dessas infecções causadas por CNA é o uso de biomoléculas empregadas isoladamente ou combinadas com antifúngicos sintéticos. Diversos estudos têm comprovado a eficácia do uso de extratos vegetais e de óleos essenciais, contra essas leveduras, inclusive em isolados multirresistentes. Em seu estudo, Barros et al.

(2013), verificaram que o extrato de *Hypericum carinatum* inibiu o crescimento de todas as leveduras de *Candida* não - *albicans* testadas, sendo esse efeito fungicida em 70% dos casos. No estudo de Pippi et al. (2015), o extrato aquoso de própolis vermelha, demonstrou atividade antifúngica contra isolados de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, além de apresentar efeito sinérgico contra essas leveduras quando combinado ao fluconazol. Segundo Martins et al. (2015), o extrato hidrometanólico de *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) apresentou atividade antifúngica contra dezessete isolados de *Candida*, entre eles, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, sendo que os isolados de *C. glabrata* foram os mais susceptíveis a esse extrato, comparados aos demais.

Pertencente à família Myrtaceae, a *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret, também conhecida por *Feijoa sellowiana* ou goiabeira-serrana, é uma árvore frutífera que possui frutos semelhantes a goiabas, os quais são consumidos em diversos Países. No Brasil, é encontrada principalmente em áreas de clima subtropical, como o Rio Grande do Sul. *A. sellowiana* apresenta diversas propriedades biológicas estabelecidas em estudos *in vitro*, tais como atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória presentes em extratos de seus frutos e folhas.

Estudos preliminares realizados por pesquisadores da UFCSPA relataram a presença de atividade antibacteriana no extrato aquoso das folhas de *A. sellowiana*. Diante de tal fato, surgiu o questionamento de fracionar este extrato e, observar a presença de possível atividade antifúngica nessas frações. Além do que, a escolha do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. sellowiana* para realização da pesquisa, foi baseada no fato de que estudos

científicos envolvendo as frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de suas folhas, ainda não foram realizados.

A presença de possível efeito antifúngico contra as leveduras de CNA pode fazer da goiabeira-serrana um substrato promissor na busca de substâncias que sejam eficazes no tratamento de infecções fúngicas causadas por estes micro-organismos.

1.1 Objetivo geral

Tendo em vista o que foi exposto, o objetivo geral deste trabalho foi determinar a atividade antifúngica *in vitro* de frações ativas obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de folhas de *Acca sellowiana* frente a isolados de *Candida não-albicans* resistentes aos antifúngicos comerciais.

1.2 Objetivos específicos

a) Obtenção das frações ativas a partir do extrato aquoso liofilizado de folhas de *Acca sellowiana*.

b) Determinar o teor de compostos das frações ativas de *A. sellowiana* através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de fotodiodo.

c) Avaliar a atividade antifúngica das frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado frente a isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, e *C. famata*.

d) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações ativas frente aos isolados de *Candida não-albicans*.

e) Caracterizar o mecanismo de ação antifúngico das frações ativas de *A. sellowiana* através da investigação de efeitos na parede celular e membrana celular fúngica.

f) Avaliar a ação da combinação sinérgica entre as frações ativas de *A. sellowiana* associadas aos antifúngicos comerciais como fluconazol e anidulafungina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Candida*

Candida spp. são micro-organismos eucariontes pertencentes ao reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Blastomycetes, Família Cryptococcacea. O gênero *Candida* é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies (Giolo & Svidzinski, 2010). Os membros pertencentes ao gênero *Candida* são biologicamente diversos e incluem leveduras como ascomicetos (McCullough et al., 1996). Fungos do gênero *Candida*, podem ser definidos como um grupo de leveduras assexuadas, que, assim como vários gêneros anamórficos, caracterizam-se por possuir membrana celular típica com bicamada lipídica (Deák, 2006). Espécies de *Candida* são leveduras comensais eucarióticas geralmente inofensivas e, podem ser encontradas no meio ambiente, e como leveduras comensais em humanos e animais. Nos mamíferos, as espécies de *Candida* são comumente encontradas como parte da microbiota comensal normal, na pele e nas superfícies das mucosas do trato gastrointestinal e gênito-urinário (McManus & Coleman, 2014).

Um grupo heterogêneo de micro-organismos faz parte do gênero *Candida*, com mais de 17 espécies diferentes, conhecidas por serem agentes etiológicos de infecções em humanos. Entretanto, mais de 90% das infecções causadas por estes micro-organismos são ocasionadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, por serem as principais espécies de leveduras de interesse clínico (Serefhanoglu et al., 2012). Além dessas espécies, mas possuindo uma menor relevância clínica, casos de candidíase superficial e sistêmica envolvendo estirpes de *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. inconspícua*, também foram descritos (Colombo et al., 2013).

Infecções causadas por *Candida* são denominadas Candidíases ou Candidoses. Essas micoses demonstram um amplo espectro de apresentações clínicas e podem ser classificadas como infecções superficiais, cutâneas e mucosas, e infecções profundas generalizadas e de alta severidade, como é o caso da Candidíase invasiva (Sardi et al., 2013). Esse amplo espectro de infecções que variam em gravidade, desde infecção local, podem estar relacionadas com o excessivo crescimento de *Candida* da microbiota normal do hospedeiro (Park et al., 2011).

Espécies de *Candida* tornam-se patógenos quando a resistência do hospedeiro à infecção é prejudicada, local ou sistemicamente, por fatores como neutropenia, disfunção de neutrófilos, rompimento de barreiras mucosas, os quais são os principais fatores de risco para infecções disseminadas (Miceli et al., 2011).

Durante a patogênese de candidíase superficial, ocorrem etapas cruciais em que a produção de enzimas hidrolíticas é fundamental, sendo essas etapas compreendidas por adesão fúngica, colonização e subsequente penetração nos tecidos do hospedeiro (Ramos et al., 2014). Infecções causadas por *Candida* variam de acordo com as taxas de incidência, distribuição de espécies e com a susceptibilidade antifúngica, que muda constantemente (Lockhart, 2014).

Fungos do gênero *Candida* podem colonizar e infectar diversos locais e tecidos do corpo, incluindo a corrente sanguínea, mucosas, pele, bem como os principais órgãos internos em casos de infecção sistêmica (Holub et al., 2011). Um maior desenvolvimento de infecções como, candidíase mucosa e sistêmica, pode ser explicado pelo aumento do número de pacientes em risco e na possibilidade destas espécies invadirem tecidos normalmente ilesos à invasão (Beshey et al., 2013).

Um dos principais tipos de infecção local causada por *Candida* é a Candidíase vulvovaginal, a qual é mais comum em mulheres portadoras do vírus HIV, mas, também acomete mulheres saudáveis. Entretanto, casos de reinfecção e recaída clínica da doença, se sobrepõem em indivíduos imunocomprometidos (Zhang et al., 2014). A Candidíase vulvovaginal é responsável por cerca de 13 milhões de casos de vaginite em pacientes documentados anualmente na América do Norte. Pesquisas revelam que 75% das mulheres sofrem um episódio de candidíase vaginal durante a idade fértil, com a estimativa de que 5% dessas mulheres têm episódios recorrentes (Colombo et al., 2013.)

Candidíase cutânea é mais comumente causada por *C. albicans*. Quando o equilíbrio da microbiota que coloniza a pele é perturbado, pode levar ao desenvolvimento de infecção clínica na pele e unhas, podendo ocorrer em todas as idades do indivíduo. Porém, episódios recorrentes e crônicos de candidíase em idosos podem ser um indicador de uma doença subjacente, como diabetes, câncer, deficiência de vitaminas ou desnutrição (Varade & Burkemper, 2013).

Candidíase ungueal ou onicomicose é a infecção fúngica que se desenvolve nas unhas dos pés e das mãos podendo ser causada por diferentes fungos, especialmente espécies de *Candida* (Pakshir et al., 2013). Mundialmente, a sua incidência e prevalência variam de 2% a 13%, de acordo com a localização geográfica, sendo que pacientes idosos e com doenças sistêmicas como diabetes, doença vascular periférica e imunossupressão, são mais susceptíveis ao seu desenvolvimento (Nathan et al., 2014).

Candidíase oral é causada por *C. albicans*. Em um estudo, candidíase oral foi evidente em 28,6% dos pacientes HIV-positivos. Também é observada em pacientes com diabetes mellitus mal controlado, e pacientes que possuem doenças sistêmicas que afetam o estado imunológico do hospedeiro (Giannini & Shetty, 2011).

Nos casos de Candidíase esofágica, a maioria não compromete a vida do paciente, porém, leva a uma alta morbidade em pacientes HIV-positivos, especialmente em estágios avançados (González et al., 2008).

O impacto clínico das infecções fúngicas tem aumentado muito nos últimos anos, particularmente devido às leveduras do gênero *Candida* sp., às

quais têm emergido como os principais patógenos oportunistas, constituindo a quarta causa mais comum de infecções em unidades de terapia intensiva (Santos et al., 2011). *C. albicans* ainda é a espécie mais encontrada na maioria dos casos de candidíases e candidemias, entretanto, a incidência de infecções causadas por *Candida* não - *albicans* tem aumentado progressivamente nos últimos anos (Serefhanoglu et al., 2012).

2.2 Leveduras emergentes: *Candida* - não - *albicans*

C. parapsilosis, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as principais espécies de CNA de interesse clínico (Chahoud et al., 2013). Mesmo já estabelecido o reconhecimento dessas leveduras oportunistas emergentes, pouco é conhecido sobre suas características epidemiológicas, além do que, apresentam perfil de susceptibilidade variável aos fármacos antifúngicos, sendo mais difícil determinar o tratamento ideal contra esses micro-organismos (Miceli, 2011). Com isso, a relevância das infecções causadas por *Candida* não-*albicans* está baseada no fato de que estas espécies possuem resistência mais elevada aos antifúngicos tradicionais, podendo levar ao fracasso do tratamento clínico e, a maiores taxas de morbidade e mortalidade (Serefhanoglu et al., 2012).

A ativação do sistema imunitário é uma etapa importante na defesa do hospedeiro contra as infecções fúngicas. Durante as fases iniciais de infecção, mediadores pró-inflamatórios estimulam o recrutamento de células de defesa, como neutrófilos e monócitos, combatendo o agente infeccioso. De maneira oposta, no entanto, exacerbada resposta inflamatória, pode causar

danos aos tecidos e, aumentar a susceptibilidade aos patógenos oportunistas (Barros et al., 2013).

A prevalência das espécies de CNA varia conforme localização geográfica. *C. tropicalis* é a espécie mais prevalente na América Latina, enquanto que nos Estados Unidos (EUA) existe uma maior incidência de *C. glabrata* (Morii et al., 2014).

Seguida da *C. albicans*, *C. glabrata* é responsável por cerca de 20% de todas as infecções por *Candida*, com sua incidência aumentando ano após ano principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Visto que, em indivíduos saudáveis, seu desenvolvimento é limitado, devido à ação do sistema imune inato destes indivíduos (Roetzer et al., 2011). A prevalência de casos de Candidíases orais causadas por CNA no Brasil vêm crescendo. As causas para seu desenvolvimento são complexas, envolvendo fatores locais, como higiene oral do indivíduo e, a associação destes com doenças sistêmicas, como diabetes. Sanitá et al. (2013), demonstraram que 93,3% de isolados de *C. glabrata* eram resistentes aos antifúngicos azólicos.

Em casos de Candidíase vulvovaginal, isolados de CNA têm sido relatados frequentemente. No Brasil, em mulheres HIV-positivas foram identificadas espécies de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*; já em mulheres saudáveis, as únicas espécies encontradas foram *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Oliveira et al., 2011).

Recentemente, dados de hospitais privados que realizam um grande número de transplantes de órgãos, onde a prática de profilaxia com fluconazol em pacientes de alto risco parece ser mais comum, indicam que a

prevalência de *C. glabrata* entre os agentes causadores de fungemia, atinge mais de 10% dos casos (Colombo et al., 2013). No Brasil, por Guimarães et al., (2012), encontraram que as CNA são responsáveis por 61% dos relatos de candidemias, sendo a *Candida tropicalis* a espécie mais frequente (24%) dos casos, e a mais comum em idosos. *Candida parapsilosis* foi mais encontrada em pacientes jovens (21%) e *Candida glabrata*, responsável por apenas 7% dos casos. De acordo com *The Brazilian Network Candidemia Study*, na última década, no Brasil, *C. albicans* foi responsável por 40,9% dos casos, seguido de *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (Sardi et al., 2013).

O aumento de infecções como candidíase mucocutânea e sistêmica, pode ser explicado por um elevado número de pacientes em risco, e pela possibilidade destas leveduras invadirem tecidos íntegros (Beshey et al., 2013). Alguns fatores foram relacionados a casos de candidemia por espécies de *C. não - albicans*, entre eles o contato prévio com os fármacos antifúngicos, pacientes do sexo feminino e o uso nutrição parenteral (Papadimitriou-Olivgeris et al., 2014).

As infecções fúngicas invasivas associam-se a altas taxas de mortalidade e morbidade quando, por exemplo, carecem de um diagnóstico precoce, que resulta no atraso do tratamento adequado (Pemán & Salavert, 2013).

O insucesso do tratamento clínico antifúngico pode estar ligado a fatores relacionados ao hospedeiro (estado imunitário, sítio da infecção), fatores relacionados com o antifúngico (dosagem, farmacocinética, interações

do fármaco com o hospedeiro), e, finalmente, os fatores relacionados ao fungo patogênico (tamanho do inóculo, capacidade de produzir biofilme e resistência) (Dannaoui, 2013).

Casos de Candidemia devido à *Candida glabrata*, estão se tornando cada vez mais comuns e os isolados de *C. glabrata* cada vez mais resistentes aos agentes antifúngicos azólicos e equinocandinas (Chander, 2013). Grande parte dos isolados de *C. glabrata* possui menor susceptibilidade aos agentes antifúngicos azólicos (Nakayama et al., 2011). *Candida parapsilosis* é conhecida como uma das principais causas de candidemias, principalmente entre recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos, estando associada a infecções desenvolvidas por dispositivos intravenosos e nutrição parenteral. Esses pacientes são considerados de alto risco para doenças invasivas, provavelmente devido à capacidade de *C. parapsilosis* de formar biofilmes na superfície de dispositivos de longa permanência e materiais protéticos (Toro et al., 2011). *Candida krusei*, a qual é responsável de 1 - 5% de candidemias e é intrinsecamente resistente ao fluconazol, tem sido relatada principalmente em pacientes com câncer e, em particular, em pacientes que receberam terapia profilática com antifúngicos (Schuster et al., 2013).

2.3 Terapia antifúngica para o tratamento de candidíases e candidemias

Apesar da intensa pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, existem somente alguns antifúngicos disponíveis para tratar infecções causadas por *Candida* spp. (Vandeputte et al., 2012).

Fármacos azólicos como o fluconazol, e fármacos poliênicos como anfotericina B, são os agentes antifúngicos mais comuns utilizados na prática clínica para o tratamento das candidíases (Barros et al., 2013). Entretanto, para casos de infecções mais graves e difíceis de serem tratadas existem antifúngicos mais eficazes, que incluem a classe das equinocandinas, composta por caspofungina, micafungina, anidulafungina e, os mais novos triazóis de última geração, voriconazol e posaconazol (Park et al., 2011).

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 (Sahu et al., 2013). O mecanismo de ação de fármacos azóis se dá na membrana celular dos fungos, inibindo a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, dependente do citocromo P-450. Como consequência, ocorre inibição da biossíntese do ergosterol presente na membrana da célula fúngica. Dessa forma, ocorre um acúmulo de esteróis metilados que são tóxicos para o micro-organismo além de depleção nos níveis de ergosterol, inibindo o crescimento das células (DiDomenico et al., 1999). Esse mecanismo está relacionado à ligação da base nitrogenada do anel azólico ao ferro contido no grupamento heme, do substrato do citocromo P450 (Shalini et al., 2011). Os principais antifúngicos poliênicos envolvidos no tratamento de infecções por *Candida* incluem a anfotericina B e a nistatina.

Polienos (anfotericina B e nistatina) são antifúngicos macrocíclicos produzidos pela bactéria *Streptomyces* que possuem em sua molécula

estruturas hidrofílicas e lipofílicas (Brautaset et al., 2008). Seu mecanismo de ação ocorre na membrana da célula fúngica através de sua complexação com o ergosterol presente nessa membrana, promovendo o aumento na permeabilidade celular com a formação de canais transmembranares por onde ocorre o extravasamento do conteúdo celular, levando à morte do micro-organismo (Butani et al., 2014). A anfotericina B - desoxilato (AmBD) é insolúvel em água, devendo ser administrada de forma intravenosa (Tiphine et al., 1999).

Alilaminas são agentes antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções superficiais causadas por *Candida* spp. Seu mecanismo de ação, semelhante aos azóis, age na biossíntese de ergosterol, entretanto, inibem a enzima esqualeno-oxidase, acarretando em acúmulo intracelular de esqualeno, tóxico para as células, levando a morte dos micro-organismos (Gimeno-Carpio, 2006).

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos solúveis em água que possuem um novo mecanismo de ação antifúngico. Ao contrário dos polienos ou azóis, que atuam sobre a membrana celular fúngica, as equinocandinas agem na parede da célula fúngica, sendo menos tóxicas para os humanos pelo fato de os mamíferos não possuírem parede celular em suas células (Proia, 2006). Essas moléculas agem inibindo a (1,3) β -D-glucanase, enzima responsável pela síntese de β -glicano, um importante componente da parede celular de diversos fungos, tais como *Candida* spp., ocorrendo, dessa forma, o rompimento da parede celular dos fungos,

resultando em instabilidade osmótica e morte celular (Petrikos & Skiada et al., 2007).

2.3.1 Terapia para candidíase superficial e cutânea

O tratamento para candidíases superficiais e cutâneas envolve antifúngicos tópicos como nistatina e, orais, como os imidazólicos. A nistatina possui amplo espectro de ação e baixa solubilidade em água, porém, sua administração é somente tópica, sendo utilizada para candidíase local ou superficial, podendo ser encontrada na forma de cremes, géis e pomadas (Muzyka & Epifanio, 2013). Sua administração oral não é recomendada por possuir alta toxicidade quando administrada de forma sistêmica e, baixa biodisponibilidade (Semis et al., 2011).

Fármacos imidazólicos, conhecidos como clotrimazol, econazol, cetoconazol e miconazol, apresentam baixa polaridade e pouca biodisponibilidade oral devido ao seu metabolismo de primeira passagem, sendo pouco absorvidos sistemicamente e, com isso, usados somente como tratamento tópico para candidíases superficiais (Bhatnagar et al., 2011).

A terbinafina é a principal alilamina indicada para o tratamento de infecções superficiais causadas por leveduras do gênero *Candida*. Quando administrada por via tópica, é segura e bem tolerada (Gimeno-Carpio, 2006).

2.3.2 Terapia para candidíase mucocutânea

A nistatina é o agente mais utilizado para o tratamento inicial de Candidíase orofaríngea. Após, havendo necessidade, são utilizados

antifúngicos sistêmicos como anfotericina B e fluconazol (Epsteint, 2003). Dessa forma, o fluconazol é o tratamento de escolha para casos recorrentes de candidíase orofaríngea que respondam mal aos tratamentos tópicos (Ferreirós et al., 2012).

Em 1994, o fluconazol foi aprovado para ser utilizado como única dose para administração oral para o tratamento de Candidíase vaginal, orofaríngea, esofágica, e peritonites, em pacientes não-neutropênicos e neutropênicos. Com isso, foi considerado o fármaco padrão ouro para combater essas infecções (Kathiravan et al., 2012). Em casos de esofagite causada por *Candida* spp., uma taxa de cura de 70 - 90% e excelente tolerância, são demonstradas pelo fluconazol. Entretanto, a presença de isolados resistentes requer o uso de alternativas terapêuticas para essa infecção (González et al., 2008).

O tratamento atual para Candidíase vulvovaginal, depende fortemente de triazóis como fluconazol, itraconazol e, o novo posaconazol, embora a resposta do paciente a esses fármacos seja lenta e com alto risco de reinfecção (Zhang et al., 2014).

Infelizmente, a frequente prescrição do fluconazol por médicos, para a profilaxia ou tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. conduziu na seleção de isolados resistentes. Dessa forma, o fluconazol vem se tornando menos eficaz contra esses isolados resistentes (Vandeputte et al., 2012).

2.3.3 Terapia para candidíase invasiva

Descoberta em 1964, a flucitosina (5 – fluorocitosina: 5-FC) é ativa contra leveduras de importância clínica como *Candida* spp. A 5-FC é administrada em associação com outros antifúngicos para o tratamento de Candidíase invasiva em locais onde a penetração dos demais antifúngicos seja difícil, como os olhos ou sistema nervoso central. Sendo também indicada, para o tratamento de infecções em que as leveduras sejam resistentes a primeira linha de agentes antifúngicos (Denning & Hope, 2010). Devido às preocupações envolvendo resistência antifúngica relacionada à monoterapia com flucitosina (relatada em *C. glabrata*, por exemplo) e, sua toxicidade decorrente de altas doses administradas para combater essa resistência, a 5-FC vem sendo pouco utilizada no tratamento de infecções por *Candida* spp. (Steier et al., 2013).

A anfotericina B era o único antifúngico eficaz no tratamento de infecções fúngicas invasivas antes da descoberta dos fármacos azólicos, introduzidos comercialmente na década de 1990, acelerando o desenvolvimento de novos antimicóticos. Antifúngicos azólicos atualmente são os fármacos de escolha no tratamento de Candidíase invasiva. Visto que, apresentam superioridade às demais classes de antifúngicos devido ao seu amplo espectro de atividade, toxicidade relativa e perfis de segurança aceitáveis (Li et al., 2014). O voriconazol, triazólico de segunda geração, é administrado de forma oral ou parenteral para o tratamento primário de candidíases invasivas em pacientes não-neutropênicos (Groll, 2011).

As equinocandinas podem ser uma alternativa ao tratamento com anfotericina B ou com triazóis em candidíase invasiva. Essa classe de antifúngicos possui potente atividade fungicida contra espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e, até mesmo, apresentam uma Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) menor contra *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, também possuindo atividade contra essas espécies (González et al., 2008).

Por possuírem baixa biodisponibilidade oral, as equinocandinas devem ser administradas por via intravenosa (Sganga et al., 2012). Como exemplo de equinocandina, a anidulafungina (AND) é um antifúngico de amplo espectro indicado para o tratamento de Candidemias e outras formas de Candidíase invasiva em pacientes adultos não-neutropênicos, exibindo potente atividade fungicida *in vitro* contra uma ampla variedade de espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes ao fluconazol (Mayr et al., 2011).

2.4 Resistência aos antifúngicos e mecanismos de resistência em *Candida* spp.

2.4.1 Aspectos gerais

Através de métodos de referência disponíveis atualmente para realização de ensaios de susceptibilidade antifúngica para leveduras, como o documento M27 - A3, padronizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), a detecção da resistência *in vitro* aos fármacos antifúngicos, é possível (Morace et al., 2014).

Apesar da disponibilidade de agentes antifúngicos, a incidência de micoses, altas taxas de mortalidade e a complexidade do tratamento podem na maioria das vezes serem atribuídas ao desenvolvimento de resistência à terapia antifúngica, com uma maior predisposição especialmente em pacientes com a imunidade comprometida, como pacientes de SIDA, idosos e transplantados (Srinivasan et al., 2014).

Fármacos azólicos, especialmente o fluconazol, são amplamente utilizados contra *Candida* spp. devido a sua boa tolerabilidade e biodisponibilidade. Entretanto, o uso aumentado e indiscriminado do fluconazol para o tratamento de infecções mucosas e sistêmicas causadas por *Candida*, resultou em seleção de isolados resistentes. A seleção de isolados resistentes ocorre principalmente em pacientes com infecções disseminadas com risco de morte, especialmente na presença de doença grave subjacente ou imunodeficiência, podendo acarretar em um quadro clínico grave (Tobudic et al., 2012). Por outro lado, a prevalência de isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos não tem sido extensivamente estudada entre indivíduos imunocompetentes portadores de infecções causadas por *Candida* (Lyon et al., 2008).

Resistência antifúngica pode ser definida em resistência microbiológica ou clínica, ou como uma mistura de ambas. A resistência conhecida por microbiológica pode ser subdividida em resistência primária (intrínseca), em que o fungo já possui resistência antes mesmo da exposição a determinado fármaco (por exemplo, *C. krusei* e *C. glabrata* ao fluconazol), ou resistência secundária (adquirida), em que a resistência se desenvolve em

resposta à exposição ao fármaco (Rogers, 2006). A resistência microbiológica ocorre quando o crescimento do micro-organismo patogênico é inibido por uma concentração do agente antifúngico superior a aquela utilizada para as demais cepas selvagens, já a resistência clínica, é definida pela situação em que o micro-organismo infectante é inibido por um agente antifúngico em uma concentração que está associada com uma alta probabilidade de falha terapêutica, levando a persistência da infecção no paciente (Pfaller, 2012).

As leveduras desenvolvem mecanismos para combater os efeitos fungicidas ou fungistáticos gerados pelas classes de antifúngicos, os quais estão baseados em três mecanismos principais: (a) redução no acúmulo do fármaco no interior da célula fúngica, (b) diminuição da afinidade do fármaco pelo o seu sítio ativo na célula, (c) modificações metabólicas para contrabalançar o efeito do fármaco (Vandeputte et al., 2012). Mais que um mecanismo de resistência pode estar associado em um isolado resistente, e as alterações que conduzem à resistência podem ocorrer em sequência desenvolvendo efeitos aditivos ou levar a resistência cruzada (Paffler, 2012).

2.4.2 Mecanismos de resistência das espécies de *Candida* aos fármacos azóis

Historicamente, a preocupação com a resistência aos azóis começou em meados dos anos 1980 com o tratamento de Candidíase orofaríngea em pacientes HIV-positivos que utilizavam o fluconazol. Como consequência, o tratamento realizado com posologia inadequada decorrente de

uma subdosagem aliado ao fato do fluconazol ser fungistático, contribuiu largamente para a seleção de isolados clínicos resistentes (Noël, 2012).

Resistência adquirida em isolados de *Candida* spp. ocasionada por antimicóticos azólicos, é um fenômeno estudado extensivamente em pacientes portadores de SIDA com relatos de Candidíase mucocutânea recorrente. Atualmente, com a utilização de terapia antirretroviral mais efetiva, a prevalência de isolados resistentes reduziu, mas continua presente, especialmente quando o tratamento antifúngico é administrado em longo prazo nesses pacientes (Dannaoui, 2013).

Existem dois principais mecanismos moleculares de resistência aos azóis em leveduras do gênero *Candida*. O primeiro mecanismo envolve a superexpressão do gene ERG11 e mutações. A enzima 14- α -desmetilase (Erg11p), atua como o alvo de ação dos azóis, sendo codificada pelo gene ERG11. Uma regulação positiva poderia resultar em resistência, enquanto mutações seqüenciais poderiam diminuir a afinidade entre a enzima 14- α -desmetilase e o fármaco. O segundo mecanismo de resistência é a expressão aumentada de bombas de efluxo, proteínas transmembranares presentes em todos os organismos vivos. Possuindo funções importantes de desintoxicação, essas bombas fazem com que o fármaco não permaneça no interior da célula fúngica, resultando em falha da acumulação intracelular do fármaco (Morace et al., 2014). As mutações pontuais no gene ERG11 podem resultar em mudanças conformacionais que afetam a afinidade do fármaco ao sítio alvo, porém, não afetam a função da enzima na biossíntese de ergosterol. Um aumento da expressão de gene ERG11 contribui para a resistência aos

azólicos porque o aumento da produção de 14- α -desmetilase pode exceder a capacidade inibidora destes antifúngicos (Ribeiro & Paula, 2007).

A super-regulação de bombas de efluxo codificadas por genes MDR (*Multiple Drug Resistance*) ou CDR (*Candida Drug Resistance*) tem sido associada com a resistência aos azóis em *C. albicans* (MDR1, CDR1 e CDR2), em *C. glabrata* (Cg CDR1 e Cg CDR2), ou *C. dubliniensis* (Cd MDR, Cd CDR1), a indução de bombas de efluxo codificadas por genes CDR tende a afetar todos os azóis (Pffaler, 2012).

2.4.3 Mecanismos de resistência das espécies de *Candida* aos demais fármacos antifúngicos

Recentemente, tem sido relatada resistência nos isolados de *Candida* spp. às equinocandinas. As infecções causadas por esses isolados clinicamente resistentes a essa classe de antifúngicos, envolvem mutações nos genes FKS1 e FKS2, que codificam a síntese de β -1,3-D-glucana sintase, enzima que atua como o alvo de ação das equinocandinas (Pfaller et al., 2011). Mutações nesses genes foram relatadas em *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Estudos cinéticos de inibição demonstraram que a sensibilidade da β -1,3-D-glucana sintase, foi reduzida devido a substituições em vários aminoácidos, decorrente de mutações (Espinel-Ingroff & Cantón, 2011).

Casos de resistência envolvendo anfotericina B são raros. Quando existentes, estão relacionados com o bloqueio da biossíntese de ergosterol ocasionados por mutação. Além de mutações, o estabelecimento de uma via

acessória para a síntese de outros esteróis de membrana essenciais à sobrevivência da célula fúngica, também estaria envolvido. Mutações na enzima D-5,6-desaturase, codificada pelo gene *ERG3*, foram a fonte de resistência à anfotericina (Dannaoui, 2013).

Foi evidenciado em trabalhos anteriores que isolados de *C. albicans* e *C. lusitanae* apresentaram resistência à flucitosina (5-FC) decorrente de um defeito na enzima purina-citosina permease (PCP), codificada pelo gene *FCY2* e, responsável pelo transporte de 5-FC para o interior da célula fúngica. Como consequência dessa alteração, a PCP é incapaz de transportar 5-FC para dentro da célula em isolados resistentes (Florent et al., 2009).

2.5 Terapia antifúngica mediante a associação de fármacos

O arsenal de agentes antifúngicos existentes para o tratamento de infecções fúngicas é extremamente limitado, aliado à seleção cada vez maior de diversos fungos patogênicos resistentes. Superar essa resistência pode ser considerada a chave para melhorar as estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas (Srinivasan et al., 2014). Devido a essa gama limitada de agentes antifúngicos disponíveis e, altas taxas de resistência, a opção pela terapia de combinação antifúngica está sendo explorada para melhorar as percentagens de cura, para permitir a redução da dose, e assim, diminuir a toxicidade nos pacientes tratados (Ha et al., 2011).

A terapia de combinação antifúngica é atraente uma vez que oferece a possibilidade de sinergia ou, pelo menos, aditividade entre os fármacos utilizados (Ostrosky-Zeichner, 2008). Uma das principais justificativas teóricas

para a terapia de combinação é poder ampliar o tratamento em pacientes gravemente doentes, com infecções mistas buscando superar a emergência de isolados resistentes e mutantes (Alves et al., 2012). 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 (Pippi, 2014).

Os mecanismos sinérgicos de interações medicamentosas contra isolados resistentes podem ocorrer de duas maneiras, superando a resistência destes isolados e por reforçar a atividade antifúngica (Liu et al., 2014).

Quando a combinação de fármacos apresenta sinergismo, ela pode ser utilizada para melhorar a eficácia da terapia antifúngica em infecções difíceis de tratar, expandindo a atividade antifúngica. Por exemplo, a terapia combinando anfotericina B + voriconazol, ou dois azólicos, fluconazol + itraconazol, a qual tem sido utilizada com boa resposta clínica em pacientes HIV-positivos (Spader et al., 2013). Paralelo a isso, são realizados estudos que avaliam a atividade antifúngica de substâncias não antifúngicas, e o desenvolvimento da terapia de combinação antifúngica eficaz envolvendo tais compostos (Nyilasi et al., 2010). Tal fato pode ser observado por Da Silva et al. (2013) em que a associação de fluconazol mais amiodarona, (utilizado para o tratamento de arritmias) *in vitro*, obteve efeito sinérgico frente a isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol.

A maioria dos estudos clínicos, demonstra resultados semelhantes para a terapia de combinação antifúngica quando comparados com a monoterapia, embora os *endpoints* (valores que definem resistência ou

sensibilidade para cada antifúngico) demonstrem vantagens para a terapia combinada (Ostrosky-Zeichner, 2008).

2.6 Alternativas para terapia antifúngica utilizando substâncias de origem vegetal

Tendo em vista os problemas expostos anteriormente relacionados à resistência antifúngica, efeitos adversos desenvolvidos pelo paciente no decorrer de tratamentos antifúngicos longos e, alto custo para o paciente, tem se buscado cada vez mais por novas estratégias de tratamento antifúngico que consigam superar esses problemas. Estudos envolvendo óleos essenciais e extratos vegetais têm mostrado que derivados de plantas medicinais têm propriedades antimicrobianas altamente significativas (Ahmad et al., 2013).

2.6.1 Aspectos gerais

Nos últimos anos, foram realizados esforços para superar a seleção de fungos resistentes utilizando combinações de fármacos antifúngicos. No entanto, os altos custos do tratamento para o paciente e diversos efeitos adversos impuseram limitações sobre essa terapia antifúngica, além do que, resultados contraditórios tanto de ações sinérgicas ou ações antagônicas, demonstrados por várias combinações antifúngicas, também foram relatados (Liu et al., 2014).

Considerando o surgimento de adversidades envolvendo a terapia utilizando fármacos sintéticos, a busca por novas substâncias com atividade antifúngica que ofereçam eficácia contra leveduras resistentes e perfil de

segurança ao paciente, se faz demasiadamente necessária. Porém, a descoberta de um novo fármaco é um processo longo e dispendioso, visto que, foram necessários trinta anos desde ao surgimento até a aprovação pela FDA - *Food and Drug Administration*, para que a mais nova classe de agentes antifúngicos, as equinocandinas, fosse liberada para comercialização (Butts et al., 2012). Além disso, a estagnação no avanço de novos medicamentos, aliada à presença cada vez mais acentuada de isolados resistentes, obriga o desenvolvimento de uma estratégia complementar às existentes (Faria et al., 2011).

Devido à vasta biodiversidade de fontes naturais, a variedade de espécies vegetais encontradas no Brasil com propriedades farmacológicas, é extensa e, vêm sendo utilizada com fins profiláticos e curativos em diversos tipos de infecções há muitos anos (Silva, et al., 2012). Extratos e preparações de origem vegetal são amplamente utilizados na medicina popular, visto que, elas representam uma alternativa econômica, são acessíveis e podem ser aplicáveis a diversas patologias (Sardi et al, 2013).

Substâncias de origem vegetal aparecem como uma fonte para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antifúngica, utilizadas isoladamente ou em associação no tratamento já existente contra infecções causadas por *Candida*, ou ainda como modelo para o planejamento de novas moléculas. Conseqüentemente, muitos extratos vegetais têm sido alvo de estudos por pesquisadores, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, que em sua maioria, dispõe de poucos recursos financeiros (Oliva et al., 2013). O potencial fitoquímico, efeitos sinérgicos e mecanismos de

ação de biomoléculas presentes em plantas, estão sendo avaliados em diferentes áreas do conhecimento (Martins et al., 2015).

Vários autores têm estudado óleos essenciais e extratos vegetais, o demonstrando que esses derivados vegetais têm propriedades antibióticas altamente significativas (Rosato et al., 2008). Uma grande variedade de metabólitos secundários ativos produzidos por diferentes espécies vegetais, como taninos, terpenoides, alcaloides e flavonoides, têm sido relatados devido às suas propriedades antifúngicas testadas *in vitro* (Arif et al., 2011). Os flavonoides têm despertado grande interesse por de seus potenciais efeitos benéficos na saúde humana, tais como atividade antiviral, antialérgica, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, antibacteriana, contra doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (Salas et al., 2011).

Alguns óleos essenciais melhoraram sinergicamente as atividades de antifúngicos como a anfotericina B, cetoconazol e fluconazol. Como resultado do estudo realizado por Zore et al. (2011), os terpenoides inibiram o crescimento de *C. albicans* e também agiram sinergicamente com fluconazol (FLZ). Em estudo realizado por Han (2007), o aumento das taxas de sobrevivência em ratos é notável quando os ratos portadores de candidíase disseminada por *C. albicans* são tratados com anfotericina B em associação com um extrato de semente de uva de *Vitis vinifera*, em comparação com o grupo controle, que recebeu tratamento apenas com a anfotericina B.

A baicaleína é um flavonoide originalmente isolado a partir das raízes da planta medicinal chinesa *Scutellaria baicalensis*. Em estudo realizado por Serpa et al. (2012), a avaliação da atividade antifúngica da baicaleína,

demonstrou que isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são susceptíveis à mesma, apresentando valores de concentração inibitória mínima entre 13 – 104 µg/mL contra essas leveduras.

A eficácia de extração de metabolitos secundários a partir de materiais vegetais depende da natureza química dos solventes utilizados (Araújo et al., 2014). Este estudo observou que o extrato acetona-água de folhas de *Psidium guajava* (Myrtaceae), contendo taninos e ácido gálico em sua composição, apresentou atividade antimicrobiana contra diferentes espécies de bactérias Gram - positivas e Gram - negativas. Segundo Pippi et al. (2015) foi apresentado efeito sinérgico entre a própolis vermelha Brasileira e o FLZ para a maioria dos isolados de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* testados, sendo em sua maioria, isolados resistentes ao FLZ. A análise do dano celular permitiu verificar que a combinação foi significativamente mais eficaz para todos isolados comparada às substâncias avaliadas isoladamente ($p < 0,05$). Além de atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida*, compostos naturais também demonstram ser eficazes contra fungos filamentosos. Em seu estudo, Danielli et al. (2013), avaliaram a atividade do óleo essencial de *Stenachaenium megapotamicum* puro em forma de nanoemulsão, frente a isolados de fungos dermatófitos, demonstrando que o óleo volátil apresentou atividade antifúngica contra estes fungos e a nanoemulsão melhorou o efeito do óleo volátil.

Hoje em dia, 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo são originários de plantas e, duzentos e cinquenta e dois deles, são

considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Mohammadi et al., 2014).

2.6.2 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae está presente na Austrália, sudeste da Ásia e na América do Sul, representando aproximadamente cento e cinquenta gêneros e cerca de três mil e quinhentas espécies de plantas dicotiledôneas lenhosas e verdes, conhecidas por produzir uma gama óleos essenciais. Como exemplo de espécies pertencentes à família Myrtaceae, estão o gênero *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Syzygium*, os quais são comuns em regiões tropicais e temperadas do hemisfério sul (Cheewangkoon et al., 2009). A predominância da família Myrtaceae, se dá em regiões tropicais e subtropicais do mundo.

No Brasil, fazem parte da maioria da flora Brasileira, sendo representadas por vinte e três gêneros e mil espécies de plantas (Zoghbi et al., 2011). *Acca sellowiana* é uma espécie de planta que também faz parte da família Myrtaceae, é um arbusto espesso com frutos comestíveis ou ornamentais, nativo da América do Sul, mas que tem sido cultivado em muitas áreas subtropicais.

Apesar de poucos relatos existentes na literatura, a *A. sellowiana* tem chamado atenção de pesquisadores por possuir substâncias químicas em sua estrutura que apresentam diversas atividades biológicas (Lapčík et al., 2005).

2.6.2.1 Propriedades biológicas de compostos pertencentes à família Myrtaceae

Devido a uma das principais características presentes na família Myrtaceae, serem a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais, existe o interesse de realizar pesquisas descobrindo as características de seus óleos essenciais e extratos (Donato & Morretes, 2007). Adebajo et al. (1989), encontrou atividade antibacteriana e antifúngica em óleo essencial de *Eugenia uniflora*. Nas folhas de *E. uniflora*, foram identificados compostos fenólicos, entre eles, flavonoides. O gênero *Eugenia*, conta com um grande grupo espécies com aplicações terapêuticas. Algumas de suas propriedades são: antirreumáticas, antipiréticas, anti - inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas e antinociceptivas. Compostos incluindo flavonoides, taninos e óleos essenciais que são constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, já foram isolados em espécies do gênero (Ferreira et al., 2014). Outro exemplo são os óleos essenciais obtidos das espécies de *Eucalyptus*, por apresentarem uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana, fungicida, repelente de insetos, pesticidas e atividade acaricida (Singh et al., 2012).

2.6.3 *Acca sellowiana*

Acca sellowiana, conhecida como *Feijoa sellowiana* ou goiabeira-serrana, é uma Myrtaceae endêmica da Mata Atlântica do sul do Brasil, sendo cultivada em vários países, como Colômbia, Nova Zelândia, Brasil e Turquia, pois o sabor único do seu fruto e, alto valor de mercado, a tornou uma árvore

frutífera potencialmente atraente (Fraga et al., 2013). Na bacia do Mediterrâneo, esta espécie foi introduzida no final do século dezenove, inicialmente como planta ornamental, posteriormente, as plantações de goiabeira serrana foram estabelecidas na África do Norte, Espanha, França, Portugal, Itália, e na região do Cáucaso do sul da Rússia, também foram relatadas (Ruberto & Tringali, 2004). A planta cresce como um arbusto verde de 5-8 m de altura, com flores brancas e vermelhas, folhas cheirosas, e seu fruto amadurecendo no outono, pesando de 20 a 30 g (Vuotto et al., 2000). O fruto fresco de *A. sellowiana* é apreciado pelo seu sabor característico e aroma, que são semelhantes com os de goiaba, por esta razão, é também chamada de goiabeira-serrana. Além disso, existe uma grande variedade de produtos industrializados do seu fruto, em particular na área da Austrália, na forma de geleias, xarope, licor e frutas cristalizadas (Ruberto & Tringali, 2004). No Rio Grande do Sul, especialmente na região serrana do estado, a *A. sellowiana* é considerada pioneira em todas as formações florestais (Sausen et al., 2009).

2.6.3.1 Propriedades biológicas da *A. sellowiana*

Em muitos países em desenvolvimento, cerca de 80% dos medicamentos disponíveis provêm de plantas medicinais, ao passo que, em países industrializados isso ocorre de forma menos significativa (Bontempo et al, 2007). O fruto de *A. sellowiana* contém muitos compostos voláteis, incluindo terpenos, taninos, quinonas, saponinas esteroides, flavonoides e, metil e etil - benzoato, responsáveis pelo sabor característico da fruta. Além do que, como todos os frutos exóticos, o fruto de *A. sellowiana* contém grandes quantidades

de ácido ascórbico (vitamina C), hidrocarbonetos e minerais (Vuotto et al., 2000). *A. sellowiana* também contém quantidades elevadas de bioflavonoides ou vitamina P, polifenóis-ativos, tais como catequinas, flavonóis, leucoantocianinas, proantocianidinas e naftoquinonas (Bontempo et al., 2007).

Em estudo realizado por Vuotto et al. (2000), o extrato acetônico de frutos de algumas plantas tropicais, incluindo *A. sellowiana*, demonstrou atividade antibiótica contra bactérias Gram - positivas e Gram - negativas, com maior ênfase aos frutos de *A. sellowiana*, que apresentaram a maior atividade inibitória entre as espécies de plantas testadas contra esses micro-organismos. Basile et al. (1997) descreveram um estudo da atividade antibacteriana de vários extratos de todas as partes da goiabeira-serrana. Todos os extratos foram ativos contra as cepas bacterianas, sendo que, a atividade estava mais pronunciada nas sementes, seguidas do fruto e por último, as partes vegetativas. O óleo essencial dos frutos de *A. sellowiana*, demonstrou amplo espectro e atividade antimicrobiana, especialmente contra fungos. Os componentes principais encontrados no óleo essencial foram limoneno (29%), β -cariofileno (27%), β -pineno (9%), β -pinene (3%) e estragol (1,5%), como descrito por Weston, (2010).

Os frutos também apresentam atividade antioxidante (Motohashi et al., 2000) e anticancerígena (Nakashima, 2001). Além de atividade anticancerígena, o estudo realizado por Nakashima (2001), demonstraram que duas frações ativas do extrato acetônico e extrato metanólico de cascas dos frutos da goiabeira-serrana, demonstrou potente atividade inibitória contra

bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e fungos do gênero *Candida* (*C. albicans* e *C. glabrata*). Além disso, também foi verificado o potencial da *A. sellowiana*, especialmente relacionado ao sistema digestório (Santos et al., 2009).

Lapčík et al. (2005) identificaram isoflavonas no extrato hidroetanólico das folhas de *A. sellowiana*. Entretanto, estudos futuros são necessários para elucidarem o papel das isoflavonas presentes. Até o presente momento não existem relatos na literatura sobre atividades antimicrobianas, antioxidantes e, antitumorais de extratos brutos das folhas de *A. sellowiana*, ou de frações obtidas a partir de tais extratos.

3. METODOLOGIA

3.1 Locais da realização da pesquisa

Os ensaios descritos a seguir para o desenvolvimento da pesquisa foram realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os experimentos referentes à extração e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da amostra foram realizados nos laboratórios 301 e na Central Analítica da UFCSPA. Os ensaios de avaliação microbiológica foram executados no laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia UFRGS.

3.2 Seleção e coleta da amostra para realização da pesquisa

A partir do que foi apresentado sobre o potencial benéfico da *A. sellowiana*, aliado ao fato de não haver estudos na literatura avaliando a possível atividade antifúngica do extrato aquoso de suas folhas, surgiu o interesse de fracionar este extrato determinando o potencial antifúngico de suas frações obtidas.

As folhas foram coletadas no município de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, em Julho de 2012. A identificação foi realizada pelo Dr. Ronaldo A. Wasum (UCS, RS). As espécimes testemunhas estão depositadas no herbário da Universidade de Caxias do Sul (ICN).

3.3 Seleção dos micro-organismos de interesse

Os micro-organismos selecionados para serem utilizados na pesquisa são leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Um total de dezenove isolados de cinco espécies de CNA foram testados neste estudo: *C. famata* (RL 23), *C. glabrata* (RL 02S , RL 03S , RL 12m , RL 12S , RL 22, RL 24, RL 34m, RL 34S , 37m, e 37S), *C. krusei* (CK 01), *C. parapsilosis* (RL 11m, RL 13m, RL 37m), *C. tropicalis* (17A , 57A , 94P) e como cepa padrão *C. glabrata* ATCC 40039. Alguns desses isolados são resistentes ao fluconazol e outros sensíveis. Todos os isolados são provenientes da micoteca de leveduras do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e, foram identificados fenotipicamente através do sistema automatizado Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek).

3.4 Obtenção das frações ativas a partir do extrato liofilizado das folhas de *A. sellowiana*

As frações foram obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de *A. sellowiana*. O extrato aquoso foi obtido a partir de infusão das folhas de *A. sellowiana*, empregando como solvente água aquecida à ebulição. Durante a infusão, a droga vegetal e o solvente foram mantidos em contato por 15 minutos. O fracionamento do extrato foi realizado através de cromatografia em coluna, em que 1 g do extrato, foi adicionado na coluna contendo 50 g de Sílica gel 60 Macherey - Nagel® (Düren, Alemanha) empregando acetona Sigma® (St. Louis, EUA), etanol Sigma® (St. Louis, EUA) e água destilada para compor a fase móvel. O gradiente de solventes seguiu conforme o quadro a seguir:

F1: acetona (300 mL)
F2: acetona : etanol (50:50) – 150 mL
F3: etanol (300 mL)
F4: etanol : etanol e água (70:30) – 150 mL
F5: etanol : água (70:30) – 150 mL
F6: etanol e água (70:30) : etanol e água (50:50) – 150 mL
F7: etanol e água (50:50) – 150 mL

As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório (Fisatom®), mantendo a temperatura de $45^{\circ} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Logo em seguida, as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD).

As frações foram solubilizadas em caldo RPMI 1640 Gibco® (Gran Island, EUA) para que as concentrações atingissem 1 mg/mL e 6 mg/mL. Logo após, foram preparadas alíquotas que foram mantidas a -15°C e ao abrigo da luz. Em cada experimento realizado, as amostras das frações eram

descongeladas e diluídas em RPMI 1640, para alcançarem as concentrações desejadas, as quais eram as soluções de trabalho utilizadas no ensaio em questão.

3.5 Análise das frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de *A. sellowiana* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todas as frações de *A. sellowiana* resultantes da extração em cromatografia em coluna foram submetidas à avaliação prévia por CCD.

As substâncias de referências (SR) utilizadas foram pirogalol, ácido gálico, catequina, vitexina, ácido cafeico, luteolina, rutina e ácido clorogênico, todas marca Sigma® (St. Louis, EUA). Como fase estacionária, foi utilizada placa pré-fabricada de Sílica gel G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel® (Düren, Alemanha). Foram preparadas a fase móvel 1: tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (7:10:3 v/v/v) e 2: acetato de etila, ácido fórmico e água destilada (18:1:1 v/v/v). Todos solventes possuem marca Vetec® (Xerém, Brasil). Após a migração na fase 1 as placas foram reveladas com Reagente Natural A (difetilborato de aminoetanol 1% em etanol), e solução de polietilenglicol, com posterior visualização em câmara com lâmpada ultravioleta. Posteriormente à eluição da fase móvel 2, as placas foram nebulizadas com revelador vanila sulfúrica 1% seguido de secagem em estufa a 100°C por 10 minutos. A metodologia seguiu o proposto por Wagner & Bladt (1996).

3.6 Análise de compostos fenólicos em frações ativas de *A. sellowiana* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - PDA)

3.6.1 Condições cromatográficas

A identificação e determinação do teor de catequina nas frações ativas de *A. sellowiana* foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu® modelo UPLC CBA - 20A, injetor automático SIL - 20A, acoplado a detector com arranjo fotodiodo (PDA) SPD - M 20A, pré-coluna Ultra C18 4,6 mm, Phenomenex®, e coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm) Phenomenex®.

A fase móvel constituiu de sistema gradiente: ácido fosfórico 0,05% (solução A) e acetonitrila (solução B). O ácido fosfórico e a acetonitrila empregados foram grau HPCL Tedia® (Fairfield, EUA). O gradiente de misturas empregado foi: 95% de A e 5% de B em 10 minutos; 88% de A e 12% de B em 25 minutos; 80% de A e 20% de B em 40 minutos; 70% de A e 30% de B em 50 minutos; 80% de A e 20% de B em 55 minutos e, por fim, 95% de A e 5% de B em 58 minutos. Os componentes da fase móvel foram filtrados através de membrana para filtração (0,45 μ m - Unifil®), e sonicados, por 20 minutos. A vazão empregada foi de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L. O comprimento de onda utilizado para análise foi de 280 nm. A temperatura ambiente foi mantida em $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.6.2 Preparação das substâncias referências e das frações ativas

Para realizar a análise das frações ativas de *A. sellowiana*, e identificação preliminar dos compostos presentes nas amostras, foram empregadas as substâncias de referência (SR): ácido gálico, catequina, epigallocatequina, epigallocatequinagalato, pirogalol, ácido cafeico e ácido clorogênico. Todas da marca Sigma® (St. Louis, EUA). Foram pesados 2,5 mg de cada SR e 25 mg das frações ativas F1 (fração acetônica), F2 (fração acetona : etanol) e F3 (fração etanólica), sendo transferidas respectivamente para balões volumétricos de 10 mL. As amostras foram dissolvidas em uma mistura 30:70 (acetonitrila : água purificada) e posteriormente diluídas até concentração final de 25 µg/mL para as SR e, 250 µg/mL para as frações ativas. As amostras foram filtradas através de filtros seringa (Chromafil® Xtra - PA 45-25 - 0,4µm) e colocadas em *vials*.

Para as SR e para os picos detectados nas amostras foram obtidos espectros de absorção empregando o detector de arranjo de fotodiodo.

3.6.3 Preparação da curva padrão e amostras

Uma curva padrão de catequina foi preparada nas concentrações de 10,0 µg, 20,0 µg, 25,0 µg, 30,0 µg, 40,0 µg e 50,0 µg/mL, em triplicata. As frações ativas de *A. sellowiana* foram avaliadas na concentração de: 1000 µg/mL, em triplicata. As amostras foram solubilizadas em mistura 30:70 (acetonitrila - água purificada) e analisadas por CLAE empregando as condições cromatográficas apresentadas anteriormente.

3.7 Avaliação da atividade antifúngica - *Screening*

Para a avaliação da atividade antifúngica contra isolados de leveduras oportunistas das frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. sellowiana* foi realizado o *Screening* Antifúngico. As sete frações obtidas foram solubilizadas em caldo RPMI 1640 Gibco® (Gran Island, EUA) de modo que as suas concentrações atingissem (1000 µg/mL). Foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis, em que foram adicionados 100 µL de inóculo fúngico (1 a 5×10^3) juntamente com 100 µL de cada fração a ser avaliada. O ensaio foi realizado em triplicata. O inóculo fúngico foi preparado em salina estéril e a transmitância lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm. A transmitância foi de 90%, que é equivalente a 0,5 na escala de Mcfarland, contendo de 1 a 5×10^6 células/mL. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:50 também em salina estéril e, a partir desta, a diluição final 1:20 em caldo RPMI 1640 Gibco® (Gran Island, EUA). Esse último inóculo, contendo 1 a 5×10^3 células/mL foi então utilizado para avaliar a atividade antifúngica.

3.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações ativas de *A. sellowiana*

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 no documento M27-A3 (CLSI, 2008). No primeiro poço de cada fileira horizontal da placa, foram colocados 200 µL da fração ativa a ser avaliada. Do segundo ao décimo primeiro poço

100 µL de caldo RPMI 1640 Gibco® (Gran Island, EUA). Foi retirado 100 µL da fração ativa do primeiro poço para efetuar a microdiluição seriada até o décimo poço, sendo descartados os 100 µL restantes. No décimo primeiro poços 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 duplicata, para cada isolado de levedura testada. A preparação do inóculo fúngico e das frações ativas foi realizada da mesma forma que a metodologia para Avaliação da Atividade Antifúngica - *Screening*, citada no item 3.7. As microplacas foram encubadas a 35°C por 48 h, para posteriormente ser determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração da substância na qual o micro-organismo testado não demonstra crescimento visível pelo método visual, observado através da formação ou não de um “botão” no fundo do poço da placa. O procedimento seguiu o padrão proposto e padronizado pelo CLSI, no documento M27–S4 (CLSI, 2012).

3.9 Preparo das soluções de fármacos antifúngicos utilizados

As soluções de agentes antifúngicos utilizadas durante o decorrer da pesquisa foram: solução de fluconazol (Cristália®), anfotericina B (Cristália®), e anidulafungina (Pfizer®). A solução estoque de fluconazol foi preparada com água destilada estéril, na concentração de 1024 µg/mL. A solução estoque de anfotericina B e de anidulafungina foram preparadas em DMSO, obtendo-se uma concentração de 12,8 mg/mL e 3,3 mg/mL, respectivamente. 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.

3.10 Ensaio de sinergismo - método de *checkerboard*

O efeito da associação entre a fração ativa F2 de *A. sellowiana* e os antifúngicos comerciais foi determinado a partir da técnica de microdiluição-*checkerboard* (Johnson et al., 2004). Foram utilizadas soluções das substâncias testadas em concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIM.

Para a realização do teste, foram adicionadas nos poços do quadrado central das microplacas 100 µL de caldo RPMI 1640 Gibco® (Gran Island, EUA). Posteriormente, no sentido horizontal do quadrado central das microplacas foram adicionadas alíquotas de 50 µL da substância a ser testada (fração ativa F2), em valores até oito vezes maiores e menores que as Concentrações Inibitórias Mínimas para cada isolado de *C. glabrata*: CIM / 8, CIM / 4, CIM / 2, CIM, CIM X 2, CIM X 4 e CIM X 8. No sentido vertical do quadrado central das microplacas foram adicionados 50 µL das concentrações desejadas do fármaco (fluconazol - FLZ ou anidulafungina - AND) em cada poço. Em seguida foram adicionados 100 µL do inóculo também em cada poço da microplaca, resultando num volume final de 200 µL. Nas extremidades verticais e horizontais das microplacas foram determinadas a CIM do fármaco (fluconazol - FLZ ou anidulafungina - AND), e da fração ativa F2 isoladamente, respectivamente. As soluções do fármaco e da fração ativa F2 foram

provenientes de soluções quatro vezes maiores da concentração desejada. Assim, em cada poço, há uma combinação única de concentrações entre o fármaco testado e a fração ativa F2. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 e 48 h.

Após a leitura visual das microplacas pelo método de *Checkerboard* foi verificado o dano celular das associações. As células viáveis de *Candida* remanescentes nas microplacas foram então coradas com MTT, sal tetrazolium [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-i) - 2,5 difenil-tetrazólio brometo] Sigma® (St. Louis, EUA). Primeiramente, o sobrenadante foi descartado e as leveduras foram incubadas durante 3 h a 35°C em uma solução de MTT (0,5 mg/mL). O mecanismo de ação do MTT ocorre através de sua redução por enzimas desidrogenases presente na mitocôndria da célula fúngica, formando cristais de formazan roxos solúveis em álcool. A solução de MTT foi retirada das microplacas e as leveduras coradas permaneceram no fundo de cada poço da microplaca. Os cristais de formazan de MTT foram homogenizados com 150 µL de álcool isopropílico Vetec® (Xerém, Brasil) e posteriormente, 150 µL da cada poço foram transferidos para uma nova microplaca para então ser realizada a leitura das absorbâncias. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplaca (Spectramax M2- Molecular Devices®) em dois comprimentos de onda: 570 nm e 690 nm (Chiou et al., 2001).

A partir disso, a porcentagem de dano celular foi calculada para as quadruplicatas de cada combinação da fração ativa de *A. sellowiana* com os antifúngicos FLZ e AND e a média dos danos celulares foi utilizada para

assumir o dano da combinação. O dano celular foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Dano celular \%} = 1 - \frac{(\text{ABS } 570 - \text{ABS } 690 \text{ com antifúngico})}{(\text{ABS } 570 - \text{ABS } 690 \text{ sem antifúngico})} \times 100$$

A análise da interação entre os antifúngicos foi determinada através do ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada). Esse índice foi calculado através da soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF), onde $\text{CIF}^A = \text{CIM do Antifúngico A em combinação com Antifúngico B} / \text{CIM Antifúngico A sozinho}$; e $\text{CIF}^B = \text{CIM do Antifúngico B em combinação com Antifúngico A} / \text{CIM Antifúngico B sozinho}$:

$$\text{ICIF} = \text{CIF}^A + \text{CIF}^B$$

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM A em comb. Com B}}{\text{CIM A sozinho}} + \frac{\text{CIM B em comb. Com A}}{\text{CIM B sozinho}}$$

Os resultados foram interpretados conforme o valor do ICIF: interação sinérgica ($\text{ICIF} \leq 0,5$), interação aditiva ($0,5 < \text{ICIF} < 1$), interação indiferente ($1 \leq \text{ICIF} < 4$) ou interação antagonista ($\text{ICIF} \geq 4$) (Lewis et al., 2002).

3.11 Ensaio de proteção do sorbitol

A análise da ação da fração ativa F2 de *A. sellowiana* sobre a integridade da parede celular fúngica foi realizada pelo Ensaio de Proteção do

Sorbitol segundo Escalante et al. (2008). Nesse ensaio, a determinação dos valores de CIM foi conduzida, paralelamente, com a adição de Sorbitol Sigma® (St. Louis, EUA) na concentração de 1,6 mol/L e sem adição de Sorbitol. O Sorbitol atua como protetor osmótico da parede celular fúngica, impedindo a lise das células. Dessa forma, se a fração ativa F2 de *A. sellowiana* agir na parede celular, sua CIM, assim como a de um composto que causa danos à parede celular fúngica, adquire um valor muito mais elevado quando comparada a CIM sem a presença de sorbitol. A metodologia utilizada para determinar a CIM, foi a mesma proposta no documento M27 - A3 presente no CLSI, adicionando sorbitol 1,6 mol/L quando necessário. Como controle, a técnica foi realizada do mesmo modo utilizando o fármaco anidulafungina, com e sem adição de sorbitol 1,6 mol/L.

3.12 Efeito sobre o ergosterol exógeno

Para avaliar se a fração ativa F2 possui efeito na membrana de espécies de *Candida*, a CIM foi determinada para os isolados de *C glabrata* na presença e na ausência de ergosterol exógeno. Essa metodologia foi realizada do mesmo modo que a determinação de CIM descrita pelo documento M27 - A3 do CLSI. Entretanto, com adição de concentrações crescentes (50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL) de ergosterol comercial Sigma® (St. Louis, EUA) dissolvido em dimetilformamida Sigma® (St. Louis, EUA) e, diluído em meio RPMI 1640, de forma que a concentração final do solvente não ultrapassasse 0,1%. A anfotericina B, foi testada em paralelo nas mesmas condições, como

controle positivo do método, numa faixa de concentração de 0,031 a 16 µg/mL. A leitura visual foi realizada em 48 h (Escalante et al., 2008).

3.13 Microscopia eletrônica de varredura

Para analisar possíveis irregularidades na morfologia da parede celular dos isolados de *C. glabrata*, foram analisadas fotomicrografias obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL 6060). Primeiramente, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da fração ativa F2 contra os 10 isolados de *C. glabrata* além do controle positivo. Após 48 h, realizada a leitura visual, foram retirados 10 µL (poço que continha 50% de crescimento comparado ao controle positivo) e pipetado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD) Sigma® (St. Louis, EUA). A placa foi incubada por 24 h a 35°C e, por último, as lamínulas contendo as leveduras foram retiradas e mantidas em solução tampão 0,1M de cacodilato de sódio (pH 7,2) contendo glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% a 4°C por uma noite (Moraes et al., 2015).

Por fim, as células foram lavadas com o mesmo tampão, desidratadas em uma série de 30 a 100% de solução de acetona, secas em ponto crítico de CO₂ e, revestidas com ouro em *Sputter Coater*. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS).

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de Susceptibilidade Antifúngica

As frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. sellowiana* foram testadas em 500 µg/mL contra cinco isolados de *Candida* não-*albicans* (CF RL 23, CG RL 37m, CK CK 01, CP RL 27m e CT 94P) para realização do ensaio de *screening* antifúngico. Com exceção do isolado de *C. famata* (RL 23) e *C. tropicalis* (CT 94P), as demais cepas testadas apresentaram sensibilidade frente a pelo menos, uma ou duas das frações de *A. sellowiana*, como apresentado na Tabela 1.

TABELA 1: *Screening* da atividade antifúngica de frações obtidas do extrato aquoso liofilizado de *A. sellowiana* frente a isolados resistentes de *Candida* não – *albicans*.

Isolados	Frações (500 µg/mL)						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
CF RL 23	R	S	R	R	R	R	R
CG RL 37m	S	S	S	R	R	R	R
CK CK 01	S	R	R	R	R	R	R
CP RL 27m	S	S	R	S	R	S	R
CT 94P	R	R	R	R	R	R	R

F1: fração acetônica; F2: fração acetona : etanol (1:1); F3: fração etanólica; F4: fração etanol : etanol e água (7:3); F5: etanol : água (7:3); F6: etanol e água (7:3) : etanol e água (1:1); F7: etanol e água (1:1). R: isolados resistentes em concentrações \geq 500 µg/mL; S: isolados sensíveis a concentrações \geq 500 µg/mL. CF: *Candida famata*; CG: *Candida glabrata*; CK: *Candida krusei*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*.

Para a determinação da CIM, foram testadas as frações que apresentaram atividade pelo ensaio de *Screening* (F1, F2, F3, F4, e F6), contra onze isolados de *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol (CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata*; CIM \geq 8 $\mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Não foi observada inibição de crescimento fúngico para os isolados de *C. tropicalis*. testados. Para *C. parapsilosis*, o isolado CP RL 11m não se mostrou sensível a nenhuma das frações ativas. Somente as frações F1, F2 e F3 apresentaram atividade antifúngica em concentrações menores que 500 $\mu\text{g/mL}$, o que está evidenciado nos isolados de *C. glabrata* (CG RL 37m, CG RL 12m e CG RL 34m), *C. famata* (RL 23), e *C. parapsilosis* (RL 13 m) (Tabela 2).

As frações ativas F1, F2 e F3 foram as mais eficazes para inibir o crescimento dos isolados em teste. Com isso, essas frações, juntamente com a espécie de *C. glabrata*, foram selecionadas para o prosseguimento da pesquisa.

TABELA 2: Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) expressa em µg/mL de frações ativas de *A. sellowiana* frente a isolados resistentes de *Candida não-albicans*.

Isolados/Frações	F1	F2	F3	F4	F6
CF RL 23	250	500	---	---	---
CG RL 12m	31,25	250	125	---	---
CG RL 34m	250	125	62,5	---	---
CG RL 37m	500	62,5	500	---	---
CK CK 01	500	---	---	500	---
CP RL 11m	---	---	---	---	---
CP RL 13m	250	---	---	---	---
CP RL 27m	---	---	---	500	500
CT 17A	---	---	---	---	---
CT 57A	---	---	---	---	---
CT 94A	---	---	---	---	---

F1: fração acetônica; F2: fração acetona/etanol; F3: fração etanólica; F4: fração etanol / 70:30 etanol e água; F5: 70/30 etanol e água; F6: 70:30 etanol e água / 50:50 etanol e água. (----) Isolados resistentes a concentrações ≥ 500 µg/mL. CG: *Candida glabrata*; CK: *Candida krusei*; CP: *Candida parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*.

Neste prosseguimento foram selecionados dez isolados de *C. glabrata* entre sensíveis (GC RL 02S, CG RL 03S, CG RL 12S, CG RL 34S e CG RL 37S) e resistentes (CG RL 12m, CG RL 22, CG RL 24, CG RL 34m e CG RL 37m) ao fluconazol, avaliando as suas susceptibilidades frente às frações ativas F1, F2 e F3. Os resultados demonstrados na Tabela 3.

TABELA 3: Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) em 24 e 48 h para as frações ativas F1, F2 e F3, frente a isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Isolados	F1		F2		F3	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
CG RL 02S	7,81	62,5	7,81	62,5	62,5	500
CG RL 03S	7,81	62,5	7,81	31,25	125	R
CG RL 12S	15,62	250	15,62	31,25	R	R
CG RL 34S	R	R	7,81	31,25	R	62,5
CG RL 37S	62,5	250	15,62	500	31,25	125
CG RL 12m	62,5	31,25	3,90	250	15,62	125
CG RL 22	R	R	R	R	R	R
CG RL 24	15,62	125	31,25	125	250	R
CG RL 34m	15,62	250	15,62	125	31,25	62,5
CG RL 37m	62,5	R	3,90	62,5	62,5	500

R: Isolados resistentes a concentrações $\geq 500 \mu\text{g/mL}$. CG: *Candida glabrata*.

O isolado CG RL 22 mostrou ser resistente às três frações testadas (CIM $\geq 500 \mu\text{g/mL}$). Além do que, este foi o único entre os isolados resistentes ao fluconazol testados que não apresentou sensibilidade às frações. Os demais isolados se mostraram sensíveis pelo menos a duas frações utilizadas, com valores de CIM entre (3,90 - 500 $\mu\text{g/mL}$). Além do que, pode ser observado que entre as três frações, as menores CIM, foram encontradas com a fração ativa F2, na maioria dos isolados. A fração ativa F2 apresentou maior eficácia antifúngica contra isolados de *C. glabrata*, sendo a única fração utilizada para dar seguimento à metodologia proposta.

Tendo em vista os resultados apresentados, as frações F1, F2 e F3, foram analisadas por CLAE com o intuito de verificar a presença e determinar o teor de compostos fenólicos e avaliar o perfil cromatográfico buscando correlacionar o perfil cromatográfico com a atividade biológica apresentada pelas frações.

4.2 Análise das frações ativas de *A. sellowiana* por (CCD)

Após a visualização das placas cromatográficas, e análise das amostras e SR, foi possível verificar a presença de catequina e pirogalol nas frações acetônicas e acetona – etanol.

4.3 Análise das frações ativas de *A. sellowiana* por CLAE

Após analisar o perfil cromatográfico e espectros de absorção de picos, nas frações ativas, e compara-los com aqueles obtidos na análise das SR, foi possível observar a presença de catequina nos cromatogramas referentes às frações F1, F2, F3. Na figura 1, tem-se o cromatograma catequina (SR), e do seu espectro de absorção no ultravioleta (UV). Nas figuras 2, 3 e 4, podem ser observados os cromatogramas referentes às frações F1, F2 e F3, respectivamente, juntamente aos seus espectros de absorbância no UV.

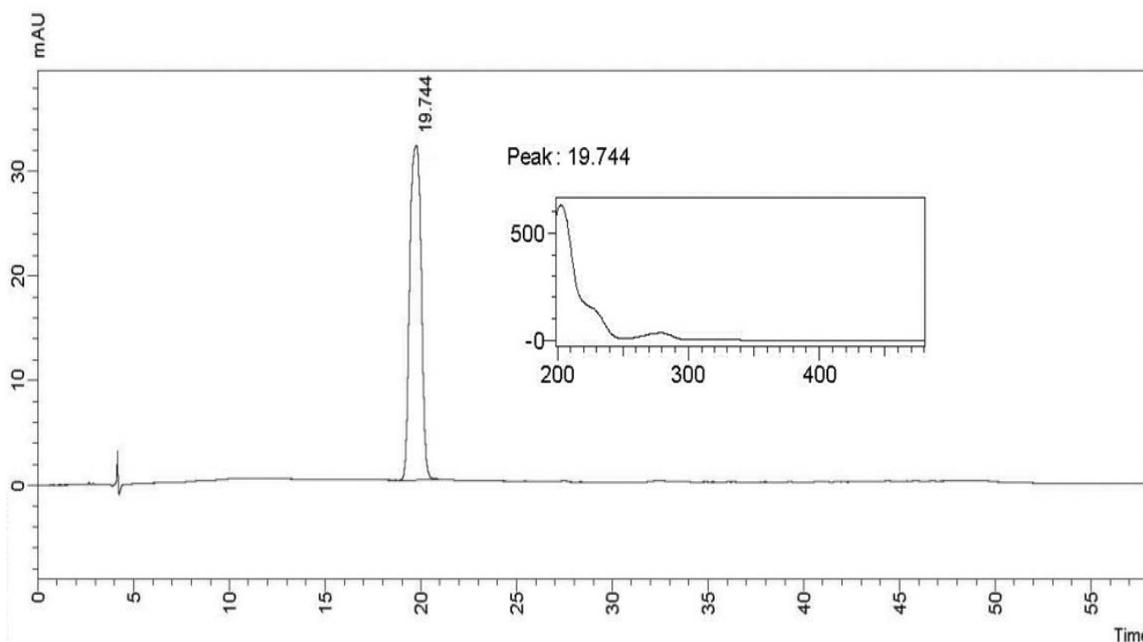


FIGURA 1: Cromatograma e espectro de absorção Substância de Referência Catequina por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L. Tempo de retenção da Catequina: 19.744.

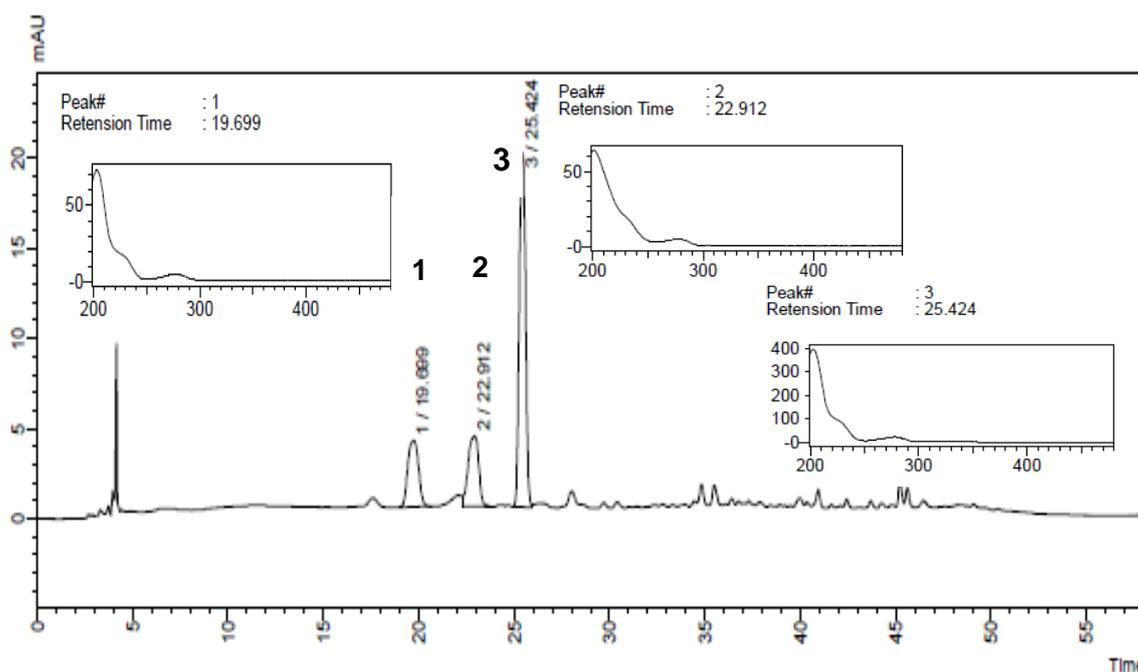


FIGURA 2: Cromatograma e espectros de absorção dos picos majoritários (picos 1, 2 e 3) detectados na fração F1 (1000 μ g/mL), por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5 μ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L. Pico 1: catequina (tr:19,699).

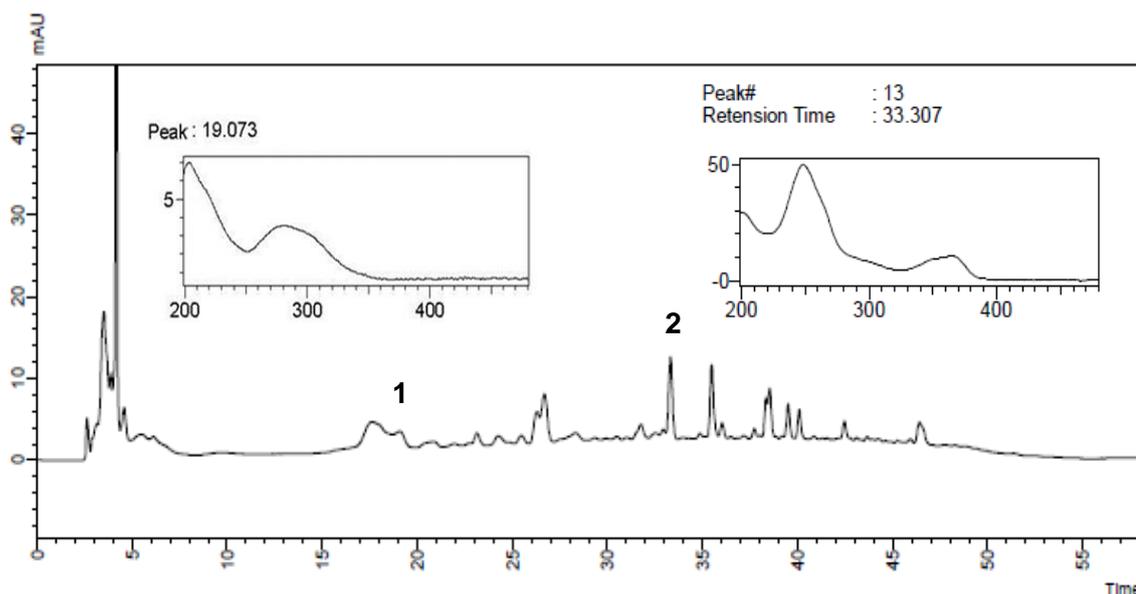


FIGURA 3: Cromatograma e espectros de absorção dos picos majoritários (picos 1 e 2) detectados na fração F2 (1000 µg/mL), por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5µ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Pico catequina (tr: 19.073).

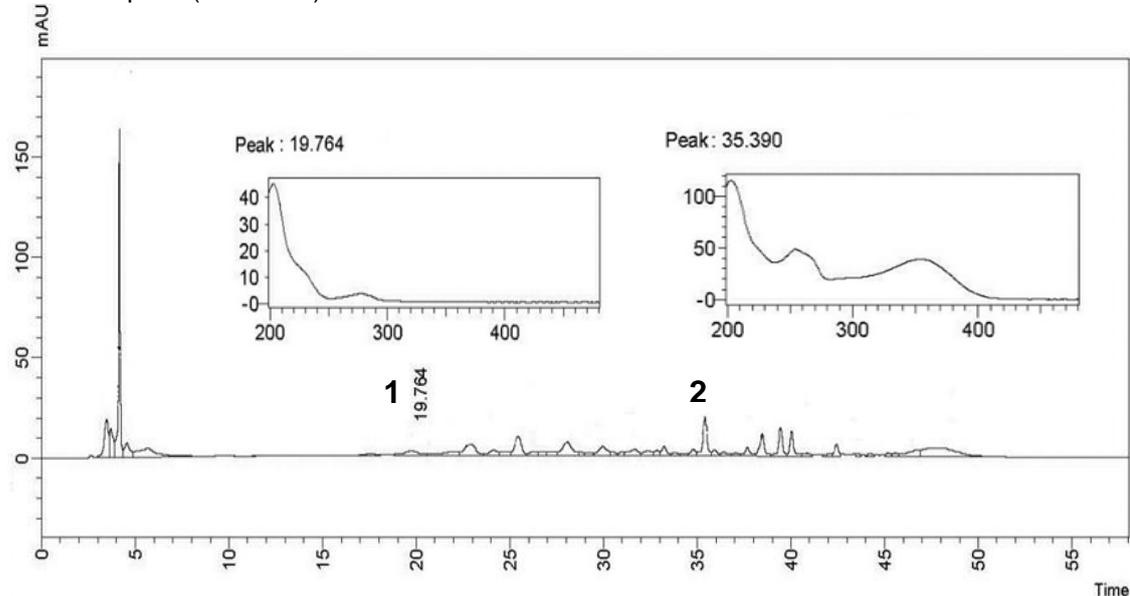


FIGURA 4: Cromatograma e espectros de absorção dos picos majoritários (picos 1 e 2) detectados na fração F3 (1000 µg/mL), por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (PDA). Comprimento de onda utilizado: 280 nm. Pré-coluna Ultra C18 4,6 mm. Coluna 5µ C18 100A (250 X 4,6 mm). Fase móvel 0,05% ácido fosfórico (solução A) e acetonitrila (solução B). Vazão: 0,7 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Pico da catequina (tr: 19.764).

4.3.1 Curva padrão da catequina e sua concentração nas frações ativas

Após a identificação da presença de catequina nas frações ativas F1, F2 e F3, foi realizada a análise de regressão e obteve-se a equação da reta, e o valor de R^2 (Figura 5).

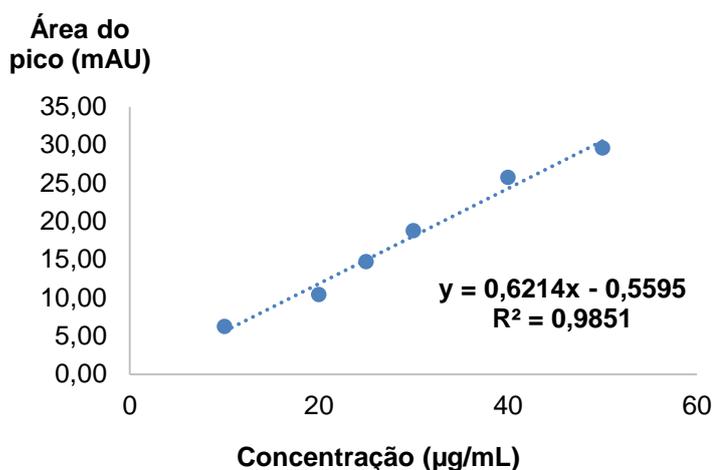


FIGURA 5: Curva padrão de catequina

Entre as três frações analisadas, a fração ativa F1 apresentou maior concentração de catequina (7,82 µg/mL), seguida da fração F2 (1,38 µg/mL) e F3 (1,30 µg/mL), respectivamente. Resultados demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4: Concentração de Catequina presente nas frações ativas F1, F2, e F3 após obtenção da curva padrão de catequina e análise de regressão.

Fração	Concentração de catequina (µg/mL)
F1	7,82
F2	1,38
F3	1,30

F1: fração acetônica; F2: fração acetona : etanol; F3: fração etanólica.
Concentração das frações: 1000 (µg/mL)

4.4 Avaliação de possível efeito sinérgico entre a fração ativa F2 com FLZ e AND através do método de *checkerboard*.

O ensaio de *Checkerboard* é um dos principais métodos para avaliação de efeitos sinérgicos, aditivos, indiferentes ou antagonistas entre fármacos e diversas substâncias. Em nosso estudo, este método foi realizado entre a fração ativa F2 em associação com o FLZ e AND (anidulafungina). Posteriormente, foi realizada a leitura com o corante MTT para verificar a viabilidade celular e, como consequência, possível dano celular gerado por essas combinações nas células de leveduras. A porcentagem de dano celular foi calculada em cada combinação existente na microplaca, de cada isolado (dados não mostrados). Através do dano celular foi calculado o ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada), em que podemos avaliar o tipo de interação desenvolvida entre as substâncias associadas.

4.4.1 Interação da fração ativa F2 com o FLZ

Para avaliar o dano celular entre a fração ativa F2 e o FLZ, após 48 h de incubação as microplacas foram coradas com o corante vital MTT e realizada leitura para avaliação de possível dano celular. O ICIF foi calculado quando o dano celular do FLZ era 50%, e da fração ativa F2, 80%. Como resultado, oito entre dez isolados demonstraram atividade sinérgica. O isolado CG RL 12m possuía a maior CIM (256 µg/mL) para o FLZ em comparação com os demais isolados quando este era avaliado sozinho, quando combinado com a fração ativa F2, sua CIM reduziu a 64 µg/mL. A associação entre o FLZ e a fração ativa F2 para o isolado CG RL 12 m, foi sinérgica. Como resultado da

interação entre o FLZ e a fração ativa F2, a CIM do isolado CG RL 22, teve uma redução de oito vezes, passando a ser 31,25 µg/mL. Em todos isolados houve redução da CIM tanto para o FLZ quanto para fração ativa F2 quando avaliados em associação. Na Tabela 4, é possível observar os valores encontrados para a CIM da combinação entre a fração ativa F2 e o FLZ, e as interações resultantes entre eles.

TABELA 5: Avaliação da interação entre a fração ativa F2 e o fluconazol (FLZ) contra isolados de *C. glabrata* através do método de *checkerboard*.

Isolado	CIM (µg/mL)		CIM Associação		Dano celular	ICIF	Interação
	F2	FLZ	F2	FLZ			
CG RL 02S	62,5	8	7,81	4	68,8	0,63	Aditividade
CG RL 03S	31,25	32	15,62	8	86,0	0,31	Sinergismo
CG RL 12m	250	256	31,25	64	89,9	0,38	Sinergismo
CG RL 12S	31,25	4	7,81	1	66,1	0,5	Sinergismo
CG RL 22	1000	128	125	16	92,1	0,25	Sinergismo
CG RL 24	125	64	31,25	16	63,4	0,5	Sinergismo
CG RL 34m	125	64	7,81	16	91,7	0,31	Sinergismo
CG RL 34S	31,25	64	15,62	16	93,1	0,75	Aditividade
CG RL 37m	62,5	64	15,62	16	94,6	0,38	Sinergismo
CG RL 37S	500	16	62,5	4	77,0	0,38	Sinergismo

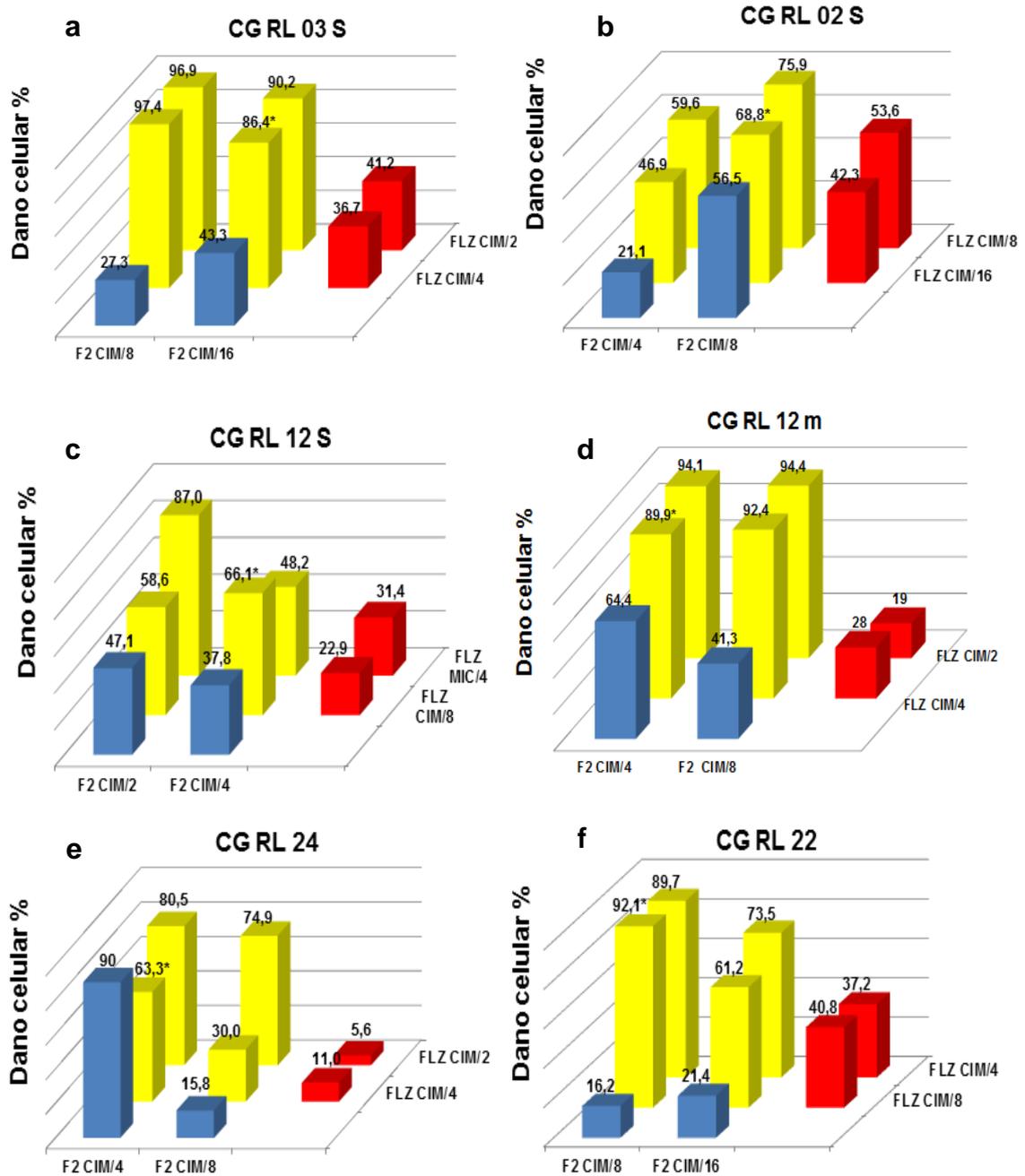
CIM: µg/mL; CIM Associação: µg/mL; Dano celular: (%); ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. F2: fração ativa acetona : etanol.

Os gráficos a seguir representam a percentagem de dano celular encontrada nas quatro melhores combinações entre a interação da fração ativa F2 e o FLZ para os dez isolados de *C. glabrata*.

Legenda:

■ Fração ativa F2
 ■ Fluconazol (FLZ)
 ■ Fração ativa F2 + FLZ

(*) Percentagem de dano celular utilizada para o cálculo do ICIF.



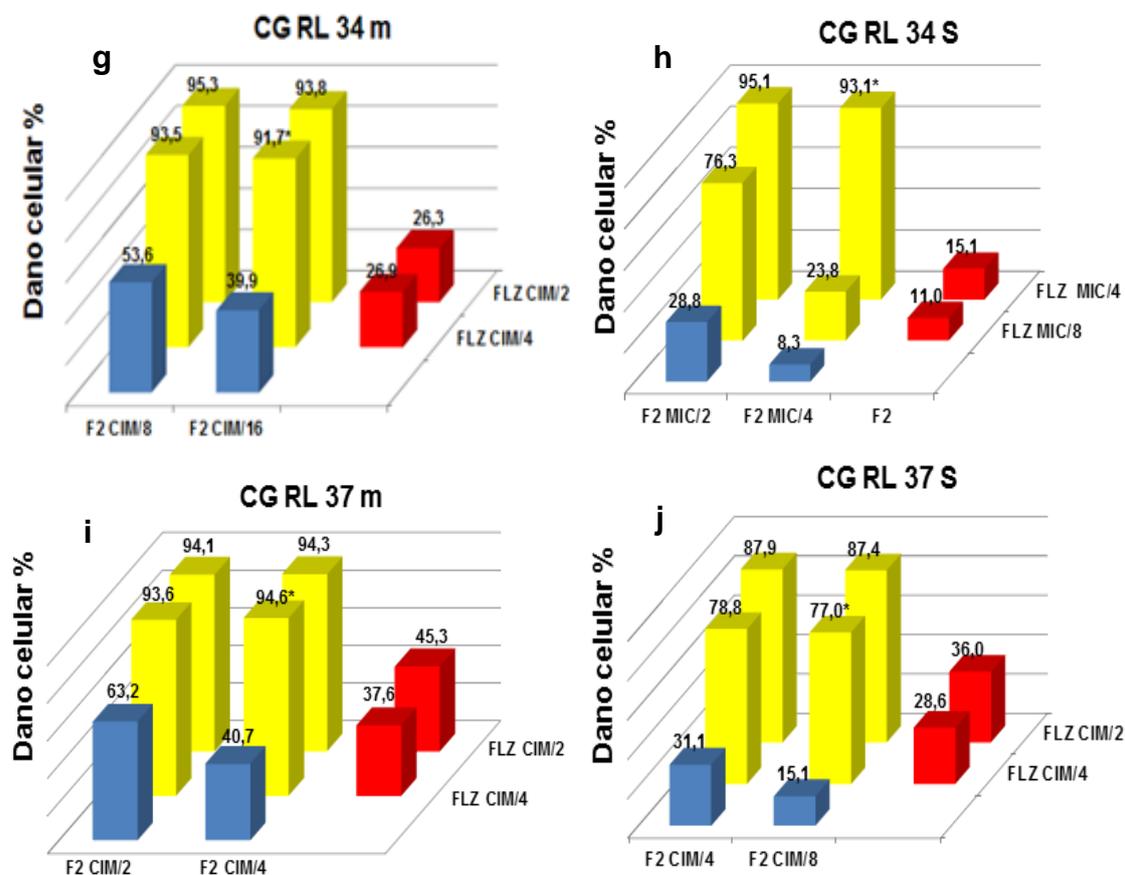


FIGURA 6: Percentagem de dano celular encontrada em quatro combinações mais eficazes entre a interação da fração ativa F2 com o fluconazol (F2 + FLZ). Eixo horizontal: Percentagem de dano celular da fração ativa F2 quando avaliada isoladamente, em duas concentrações inibitórias mínimas diferentes. Eixo de profundidade: Percentagem de dano celular do fluconazol (FLZ) quando avaliado isoladamente em duas concentrações inibitórias mínimas diferentes. Eixo vertical: Percentagem de dano celular resultante da interação entre a fração ativa F2 e o fluconazol (FLZ) em concentrações inibitórias mínimas diferentes, representando as quatro combinações mais eficazes entre a fração ativa F2 e o FLZ. a) CG RL 02S; b) CG RL 03S; c) CG RL 12m; d) CG RL12S; e) CG RL 22; f) CG RL 24; g) CG RL 34m; h) CG RL 34S; i) CG RL 37m; j) CG RL 37S.

4.4.2 Interação da fração ativa F2 com a AND

Em paralelo, também foi realizado o Método de *Checkerboard* e a leitura do dano celular através do corante MTT para avaliar a interação existente entre a fração ativa F2 e a AND (anidulafungina). O procedimento foi

realizado da mesma maneira como a combinação de F2 e FLZ, entretanto, microplacas foram incubadas por 24 h (CLSI, 2008) para a leitura da AND. Posteriormente foi realizada a leitura com MTT. Para o cálculo do ICIF, o dano celular considerado para AND e para a F2, foi 50%. Como não ocorreu ação sinérgica entre essa combinação, o maior dano celular encontrado foi 67,4% no isolado (CG RL 34m), resultando em uma ação indiferente entre as substâncias. Resultados expressos na Tabela 6.

TABELA 6: Avaliação da interação entre a fração ativa F2 e a AND (anidulafungina) contra isolados de *C. glabrata* através do método de *checkerboard*.

Isolado	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CIM Associação		Dano celular	ICIF	Interação
	F2	AND	F2	AND			
CG RL 02S	62,5	0,007	31,25	0,015	66,8	0,69	Adi
CG RL 03S	31,25	0,031	15,62	0,007	64,2	0,97	Adi
CG RL 12m	250	0,031	31,25	0,062	52,3	2,13	Ind
CG RL 12S	31,25	0,031	15,62	0,062	48,0	2,49	Ind
CG RL 22	1000	0,003	500	0,003	65,5	1,5	Ind
CG RL 24	125	0,015	62,5	0,031	53,6	2,55	Ind
CG RL 34m	125	0,007	7,81	0,015	67,4	1,99	Ind
CG RL 34S	31,25	0,031	15,62	0,007	62,4	0,75	Adi
CG RL 37m	62,5	0,015	31,25	0,007	47,1	1,02	Ind
CG RL 37S	500	0,015	250	0,007	59,0	1,02	Ind

CIM: $\mu\text{g/mL}$; CIM Associação: $\mu\text{g/mL}$; Dano celular: (%); ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. CG: *Candida glabrata* Interação: Sinergismo (Sin); Aditividade (Adi); Indiferença (Ind); Antagonismo (Ant). F2: fração ativa acetona : etanol.

4.5 Avaliação do efeito de proteção da parede celular pelo sorbitol.

Possível dano na parede celular das leveduras de *C. glabrata* foi realizado com o ensaio de proteção de Sorbitol. Os isolados escolhidos foram: CG RL 02S, CG RL 03S, CG RL 12S, CG RL 12m, CG RL 34S e, a cepa controle *C. glabrata* ATCC 40039. Como resultado, pode ser observado que em todos isolados, o aumento na CIM da fração ativa F2 e da AND na presença de sorbitol, quando comparadas a CIM da F2 e AND sem adição de sorbitol. Isso demonstra que a F2 possivelmente atue na parede celular das leveduras, assim como a AND. Resultados demonstrados na Tabela 7.

TABELA 7: Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) referentes à fração ativa F2 e anidulafungina (AND) para isolados de *C. glabrata* na presença e na ausência de sorbitol após sete dias.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	F2	AND	F2 + Sorbitol	AND + Sorbitol
CG RL 02S	62,5	0,015	500	0,031
CG RL 03S	31,25	0,125	125	0,500
CG RL 12S	62,5	0,015	1000	0,062
CG RL 12m	500	0,007	1000	0,031
CG RL 34S	62,5	0,003	1000	0,015
ATTC 40039	250	0,015	1000	0,062

CG: *Candida glabrata*. F2: fração ativa acetona : etanol.

4.6 Efeito sobre o Ergosterol exógeno na membrana celular

A anfotericina B (ANF) exerce seu mecanismo de ação na membrana celular ao formar complexos com o ergosterol presente nessas membranas. Como consequência, isso leva a formação de canais que facilitam a saída do conteúdo citoplasmático, levando à morte do micro-organismo (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009). Na presença de ergosterol exógeno, a ANF forma complexo com o ergosterol exógeno. Dessa forma, o ergosterol endógeno presente nas células, não é afetado e, com isso, a CIM da ANF aumenta.

Neste estudo, não foi observado aumento na CIM da fração ativa F2 na presença de ergosterol exógeno. Os valores de CIM se mantiveram constantes, tanto na adição como na ausência de ergosterol exógeno, em todos isolados testados. Dessa forma, a fração ativa F2 não interagiu com o ergosterol exógeno. Tal fato pode indicar que, provavelmente, esta fração não atue na membrana celular das leveduras e, seu possível mecanismo de ação, seja em outro componente da célula (Tabela 8).

Na presença de ergosterol exógeno, houve aumento da CIM da ANF comparada aos valores encontrados na ausência de ergosterol exógeno, em todos isolados testados. Isso comprova que a ANF age na membrana celular fúngica, ligando-se ao ergosterol exógeno. Estes resultados podem ser evidenciados pela Tabela 9.

TABELA 8: Avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para a fração ativa F2 em isolados de *C. glabrata* na ausência e na presença de Ergosterol exógeno.

Isolados	Concentrações de Ergosterol exógeno (mg)					
	ausente	50mg	100mg	150mg	200mg	250mg
CIM ($\mu\text{g/mL}$)						
CG RL 12S	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
CG RL 34m	125	125	125	125	125	125
CG RL 37m	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
ATCC 40039	250	250	250	250	250	250

Maior concentrado de F2 utilizada: 1000 mg/mL. CG: *Candida glabrata*.

TABELA 9: Avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para a anfotericina B em isolados de *C. glabrata* na ausência e na presença de Ergosterol exógeno.

Isolados	Concentrações de Ergosterol exógeno (mg)					
	ausente	50mg	100mg	150mg	200mg	250mg
CIM ($\mu\text{g/mL}$)						
CG RL 12S	8	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32
CG RL 34m	32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32
CG RL 37m	16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32
ATCC 40039	32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32

Maior concentração testada de anfotericina B: 32 $\mu\text{g/mL}$. CG: *Candida glabrata*.

4.7 Avaliação de dano celular através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como foi verificado pelo ensaio de proteção do sorbitol que a fração ativa F2 possivelmente exerça seu mecanismo de ação antifúngico na parede celular das leveduras de *C. glabrata*, houve a necessidade de comprovar esse efeito com a visualização da morfologia celular dos isolados de *C. Glabrata* através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Uma nova determinação da CIM para os isolados em teste foi realizada e, para análise em microscópio eletrônico de varredura, foi utilizada a CIM a qual era possível visualizar aproximadamente 50% de crescimento fúngico, comparado ao controle positivo. Assim, para cada isolado, uma concentração diferente de fração ativa F2 foi analisada. Todos os dez isolados de *C. glabrata* juntamente com a cepa ATCC 40039 foram analisados, porém, em algumas amostras foi impossível identificar a presença da levedura ou de possível dano á parede das células, isso provavelmente devido à contaminação das amostras. É possível observar entre os seis isolados a seguir, imperfeições na superfície da parede celular fúngica, desde o surgimento de “cavidades” na superfície de suas paredes, até mudanças morfológicas como o tamanho e formato das células, quando comparadas ao controle positivo (cepa ATCC 40039, cultivada apenas em meio de cultura isento da fração ativa F2). Esses resultados são mostrados na Figura 7.

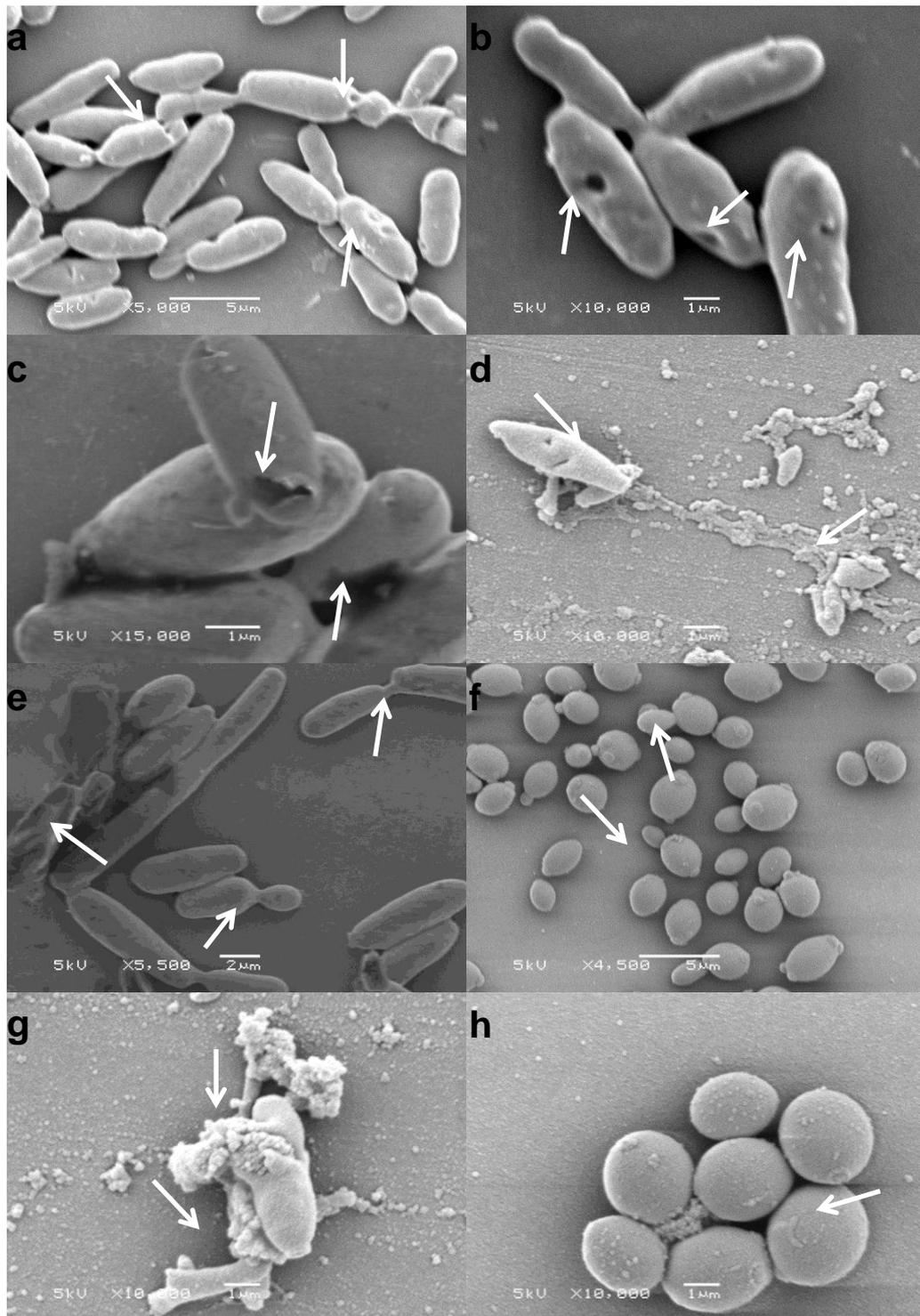


FIGURA 7: Fotomicrografias referentes à visualização dos isolados de *C. glabrata* em microscópio eletrônico de varredura (MEV). a) CG RL 02S (5000 x); b) CG RL 02S (10000 x); c) CG RL 34m (15000 x); d) CG RL 12S (10000 x); e) CG RL 24 (5500 x); f) ATCC 40039 (4500 x); g) CG RL 37m (10000 x); h) Cepa Controle ATCC 40039 isenta de F2 (10000 x). Corrente elétrica utilizada: 5kv.

5. DISCUSSÃO

O aumento da taxa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos devido a infecções causadas por CNA tem se tornado uma das maiores preocupações na clínica médica. O FLZ em particular, é o fármaco de escolha contra a maioria dessas infecções, sendo amplamente utilizado devido à sua boa tolerabilidade e baixo custo de tratamento. No entanto, a prescrição e a própria automedicação descontrolada desse antifúngico resultou na seleção e no surgimento de isolados resistentes (Tobudic et al., 2012). Desde o surgimento do fluconazol durante a década de 1990 e sua introdução como tratamento para candidíases, a terapia antifúngica vem sendo conduzida com receio a *C. glabrata* e *C. krusei*, visto que, suas baixas sensibilidades a esse fármaco e resistência cruzada com outros azólicos, são bem conhecidas (Pffaler, 2012). Tendo em vista esse cenário, nosso estudo buscou encontrar uma nova fonte alternativa terapêutica para combater a resistência antifúngica presente em isolados de CNA e, que possua eficácia contra essas leveduras.

Na avaliação da atividade antifúngica das frações provenientes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. sellowiana*, o nosso estudo mostrou ação inédita dessas frações frente a isolados resistentes de *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Em estudo realizado por Basile et al. (2010), porém, com o extrato acetônico dos frutos de *A. sellowiana*, foi observada atividade antifúngica contra isolados de *C. albicans* (CIM = 250 µg/mL) e fungos filamentosos.

Quando determinada a CIM das frações frente aos 10 isolados de CNA, as frações ativas F1, F2 e F3 demonstraram serem as frações mais eficazes, pois conseguiram inibir o crescimento fúngico na maioria dos isolados. A espécie *C. glabrata* mostrou ser a mais sensível às frações, visto que, apresentou as menores concentrações inibitórias mínimas entre as espécies de CNA testadas. A maior eficácia dessas frações pode ser devida à presença de substâncias que poderiam estar ausentes ou em menores concentrações nas demais frações.

Pertencente à família Myrtaceae, segundo Ferreira et al (2014), frações hexânicas do extrato etanólico das folhas de *Eugenia calycina*, demonstraram atividade antifúngica contra isolados de *C. parapsilosis*. Em nosso estudo, também foi evidenciada atividade antifúngica nessa espécie. Segundo Diniz et al. (2010), os extratos hidroalcoólicos de folhas de *Plinia cauliflora* (Myrtaceae) exibiram atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *C. albicans* e *C. krusei*. Frações hexânicas do extrato bruto das folhas de *Calycorectes psidiiflorus* (Myrtaceae), segundo Domingues et al. (2010), também apresentaram atividade antifúngica frente as CNA como, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Como encontrado no estudo de Correa-Royero et al. (2010), o extrato de *Myrcia cucullata* (Myrtaceae), apresentou uma forte atividade antifúngica contra 10 isolados *C. krusei* (CIM = 31,25 µg/mL), a atividade foi semelhante ou superior ao FLZ, quando avaliado em todos isolados clínicos de *C. krusei*. Entretanto, como se pode observar, os resultados achados por esses autores não demonstram concentrações

inibitórias mínimas tão baixas, nem uma capacidade de reversão da resistência a algum antifúngico associado.

Desempenhando um papel fundamental na qualidade sensorial e nutricional de frutas, legumes e outras plantas, os compostos fenólicos são metabólitos secundários derivados de espécies vegetais (Moreno-Montoro et al., 2014). Esses compostos fenólicos compreendem fenóis simples, cumarinas, ligninas, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (Khoddami et al., 2013). Nos últimos anos os flavonoides têm despertado grande interesse devido aos seus potenciais efeitos benéficos para saúde humana, tais como atividade antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, e antioxidante, além de proteção contra doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Tripoli et al., 2007; González-Molina et al., 2010; Ahmed et al., 2012).

Com a análise das frações ativas F1, F2 e F3 por CLAE-PDA foi possível determinar a presença de catequina. Quando analisadas na concentração de 1000 µg/mL, obteve-se para as frações F1, F2 e F3, as concentrações de 7,82 µg/mL, 1,38 µg/mL, e 1,30 µg/mL de catequina, respectivamente. Analisando os espectros de absorção dos demais picos cromatográficos majoritários presentes nessas frações, podemos sugerir que são característicos de compostos fenólicos e flavonoides, que não foram elucidados neste estudo.

A eficácia das frações ativas contra os isolados testados, não foi proporcional à concentração de catequina encontrada nas frações. Mesmo a fração ativa F1 possuindo maior concentração de catequina que a fração ativa

F2, nossa pesquisa seguiu utilizando a fração ativa F2 para os demais ensaios, visto que, nessa fração ativa, encontramos os menores valores de concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados de *C. glabrata* testados. Além do pico referente à catequina, foram encontrados mais dois picos majoritários na fração ativa F1, sendo que o maior pico encontrado, com tempo de retenção de 25.4, e o segundo maior pico com tempo de retenção de 22.9, que não foram detectados na fração ativa F2. Essas substâncias não foram identificadas neste estudo, mas, seus espectros de absorção no UV são característicos de compostos fenólicos derivados de catequina, que provavelmente possam interagir com a catequina, reduzindo o seu possível efeito biológico e sua expressão.

Os demais picos cromatográficos majoritários visualizados na fração F2, como, por exemplo, em 33.3 minutos, provavelmente seja indicativo de flavonoide, pois, seu espectro de absorção no UV apresenta perfil característico desse composto. A presença dessa substância juntamente com a catequina poderia explicar a maior eficácia da fração ativa F2 frente às leveduras testadas, quando comparada às demais frações. Além disso, o pico aos 33.3 minutos, característico de flavonoide, não está presente na fração F1.

Em menores quantidades comparados à fração ativa F2, flavonoides também estariam presentes nos demais picos encontrados na fração F3, com tempo de retenção de 35.3 e 39.4 minutos, já que seus espectros apresentam duas bandas de absorção no UV, a primeira aproximadamente em 255 nm, e a segunda, em cerca de 360 nm. Segundo Gaitén et al. (2010), flavonoides, principalmente flavonas e flavonóis, possuem duas bandas de absorção no

UV/VIS, a banda 1, representa o anel A e esses compostos são evidenciados em uma faixa de 320-385 nm, a banda 2, corresponde ao anel B, visualizados na faixa de 250- 285 nm.

Neste estudo, a fração F1, também inibiu o crescimento dos isolados de *C. glabrata*, porém, suas CIM foram mais elevadas e com isso menos satisfatória que fração ativa F2. Saito et al. (2013), observou que a catequina inibe o dimorfismo de *C. albicans*, inibindo a formação de hifas por reduzir os níveis de genes específicos de expressão de hifas no RNAm. Catequinas são também capazes de inibir o crescimento de muitas cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) (Stapleton et al., 2004). Park et al. (2006), encontram em seu estudo que a epigalocatequinagalato (EGCg), derivado de catequina, a qual é o principal constituinte do chá verde, obteve menores valores de CIM comparados aos valores encontrados para o FLZ e a ANF entre as 7 espécies de *Candida* testadas. Entre os isolados testados, os isolados de *C. glabrata* foram os mais susceptíveis a EGCg, demonstrando menores CIM comparadas ao FLZ. Essa mesma relação também foi evidenciada no presente estudo, demonstrando a atividade antifúngica das frações F1, F2 de F3 contendo catequina, contra os isolados de *C. glabrata* testados. Catequina e os seus derivados, quando testados por Veluri et al. (2004), apresentaram atividade antifúngica contra fungos filamentosos, como *Fusarium oxysporum*, e fungos anemófilos, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., sendo eficaz contra todos os isolados testados.

A solubilidade de catequinas depende da temperatura de extração, do tempo e o tipo de solvente utilizado. Sendo o tempo de extração e a

temperatura, os fatores chave para extrair maiores quantidades de catequinas (Gadkari & Balaraman, 2015). No presente estudo, a fração ativa F1, obtida com acetona, apresentou a maior quantidade de catequina comparada às demais frações analisadas por CLAE-PDA, demonstrando que a acetona é um solvente apropriado para extrair maiores quantidades de catequina.

A proporção de *C. glabrata* é mais comum nos EUA (22%) do que em outros países (8 a 12%). Alguns autores relacionam o uso do fluconazol com a seleção de isolados resistentes de *C. glabrata*, especialmente em centros oncológicos (Quindós, 2014). Esta espécie é responsável por 30% das Candidemias relatadas em hospitais Brasileiros devido ao uso abusivo de fluconazol nesses centros (Da Costa et al., 2014). No Brasil, *C. glabrata* é responsável por 15% dos casos de Candidíase vulvo-vaginal, seguida por 9% nos casos de candidúria (Candidíase na urina) (Colombo et al., 2013).

Produtos naturais são atualmente considerados uma alternativa interessante aos antifúngicos sintéticos para o controle leveduras resistentes, devido à eficácia, maior segurança e, baixos custos oferecidos à população (Hirasawa & Takada, 2004; Rosato et al., 2008; Shokri et al., 2011; Pippi et al., 2015).

Pesquisas envolvendo associações de fármacos sintéticos com substâncias vegetais, têm se estabelecido como uma atividade fundamental nos últimos anos. Os efeitos sinérgicos entre duas substâncias podem ser produzidos, por exemplo, se as substâncias em questão afetam diferentes alvos (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). A avaliação do dano celular após realização do método de *checkerboard* demonstrou que 80% dos isolados de

C. glabrata apresentaram atividade sinérgica entre a fração ativa F2 e o FLZ. Esses resultados comprovam que a associação entre a fração ativa F2 e o FLZ foi mais eficaz contra os isolados de *C. glabrata* testados, do que quando avaliados sozinhos, visto que, suas CIM foram menores entre suas interações. Com isso, antifúngicos como o FLZ, que demonstram falhas na sua efetividade quando utilizados como monoterapia contra esses isolados, podem desenvolver uma melhora em sua ação quando em combinação com uma formulação contendo frações ativas de *A. sellowiana*.

Neste estudo, todos isolados resistentes (CG RL 12m, CG RL 22, CG RL 24, CG RL 34m e CG RL 37m) mostraram serem susceptíveis as interações entre a fração ativa F2 e o FLZ, já entre os isolados sensíveis, apenas 60% (CG RL 03S, CG RL 12S, CG RL 37S), apresentaram susceptibilidade com efeito sinérgico decorrente dessa combinação. O isolado CG RL 37m, resistente ao FLZ, apresentou a maior porcentagem de dano celular (94,6%) comparado aos demais isolados, reduzindo sua CIM para o FLZ e para fração ativa F2 quatro vezes (MIC/4). Porém, a combinação mais efetiva foi encontrada no isolado CG RL 22, resistente ao fluconazol, pois a associação entre o FLZ e a fração ativa F2 apresentou 92,1% de dano celular e o menor ICIF encontrado (0,25), indicando forte interação entre as substâncias. Cantón et al. (2005), também relataram a presença desse fenômeno, em que isolados resistentes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* com CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, apresentaram ação sinérgica entre a interação de FLZ com o antifúngico terbinafina.

Provavelmente a ação sinérgica entre nossas substâncias ocorreu devido à fração ativa F2 e o FLZ possuírem mecanismos de ação diferentes, potencializando seus efeitos antifúngicos. Não existem relatos na literatura avaliando a interação entre frações ativas obtidas de extrato aquoso liofilizado de *A. sellowiana* e antifúngicos comerciais. Porém, estudos anteriores relacionados com extratos e frações pertencentes à família Myrtaceae têm sido satisfatórios quanto às atividades antimicrobianas. Segundo Saraiva (2012), ocorreu sinergismo entre a combinação do extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo) - Myrtaceae com antibióticos, contra *P. aeruginosa* resistente a ampicilina.

Para Baddley & Pappas (2005), interações entre substâncias podem resultar em efeitos sinérgicos de três formas: (a) a substância que age na membrana celular pode aumentar a penetração de substâncias com ação no DNA ou na síntese proteica - ANF ou azóis combinados a flucitosina (5-FC); (b) interação de agentes que inibam diferentes etapas na via bioquímica – terbinafina e azóis; (c) substância com ação na parede celular combinada com substância com ação na membrana celular – equinocandinas com azóis ou ANF.

Para Hirasawa & Takada (2004), a associação entre anfotericina B (ANF) e catequina apresentou forte efeito sinérgico contra isolados de *C. albicans*, sugerindo que a combinação pode estimular a captação de catequina para dentro da célula por ação da anfotericina B e a catequina intracelular pode atuar como um agente antifúngico. Também nesse estudo, a avaliação da combinação entre EGCg e FLZ, foi sinérgica mesmo contra isolados resistentes

de *C. albicans* ao FLZ. Esses resultados vão ao encontro do que foi evidenciado em nosso estudo com isolados de CNA. Porém o provável mecanismo de ação decorrente da interação do FLZ com a fração ativa F2 contendo catequina e possivelmente flavonoides, ainda é desconhecido.

Para Da Silva et al. (2014), foi observada interação sinérgica entre a combinação de flavonoides com o fluconazol contra todas cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, promovendo dano ao DNA e apoptose celular. Alterações morfológicas como o tamanho/granularidade das células de *C. tropicalis* foram observadas através de Citometria de Fluxo após 24 h de exposição para a combinação entre flavonoides e fluconazol. Isso vai ao encontro do presente estudo, em que, a reversão da resistência antifúngica dos isolados de *C. glabrata*, resultante da associação da fração ativa F2 com o FLZ, poderia ser explicada devido à possível presença de flavonoides na fração ativa F2, juntamente com a catequina.

Quando avaliada a interação entre a fração ativa F2 e a AND, não houve efeito sinérgico em nenhum dos isolados testados. Esse fato provavelmente ocorreu devido à fração ativa F2 e a AND possuírem mecanismos de ação, semelhantes e, com isso, possivelmente um mecanismo dificultaria o efeito do outro, gerando uma relação indiferente entre ambas às substâncias ($1 \leq ICIF < 4$).

Na avaliação de possível mecanismo de ação antifúngico através do ensaio de proteção do sorbitol, os seis isolados testados apresentaram mudanças em seus valores de CIM, ocasionando em resultados satisfatórios. A AND inibe a ação da enzima β -1,3-D-glucana sintase, responsável pela

biossíntese de componentes essenciais presentes na parede celular fúngica, levando a morte celular. Utilizada como controle do método, demonstrou maiores CIM com a presença de sorbitol, evidenciando seu efeito na parede celular. As alterações ocorreram tanto nos valores de CIM da AND, como nos valores da fração ativa F2, quando o sorbitol foi adicionado ao método, comparadas aos valores de CIM na ausência de sorbitol. Tal fato acarretou em um aumento das CIM dos isolados, indicando que a presença de sorbitol, protege as leveduras, em razão de o sorbitol atuar como protetor da parede celular fúngica. Como consequência, é possível que a fração ativa F2 exerça seu mecanismo de ação na parede celular das células de *C. glabrata*. Além disso, essa ação na parede celular poderia facilitar a penetração de FLZ no meio intracelular das células, fazendo com que o FLZ aprimore seu efeito, permitindo uma melhor resposta antifúngica. Por agir na parede celular das leveduras de *C. glabrata*, podemos sugerir que a fração ativa F2 quando combinada ao FLZ, facilita a penetração deste na membrana celular fúngica, acarretando em um efeito sinérgico e reversão da resistência desses isolados.

Pippi et al. (2015), demonstraram que o extrato de própolis vermelha, também indicou agir na parede celular das leveduras de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, além do que, esta ação, facilitaria a penetração do FLZ através da parede celular fúngica, aumentando a concentração intracelular do FLZ e, aprimorando a sua resposta antifúngica.

Nos resultados obtidos através da metodologia que avaliou o possível mecanismo de ação ocasionado pelo efeito do ergosterol exógeno, não foi observado aumento da CIM da fração ativa F2 na presença de

ergosterol exógeno, em nenhuma das concentrações testadas (50 a 250 mg/mL). Apenas a CIM da ANF aumentaram de valor, confirmando seu mecanismo de ação na membrana celular das leveduras testadas, formando complexos com o ergosterol presente nessa membrana (endógeno). Dessa forma, a fração ativa F2 provavelmente não atue na membrana celular fúngica, não havendo complexação de substâncias presentes na fração ativa F2 com o ergosterol exógeno adicionado.

Vários estudos relatam atividade antifúngica de frações e extratos de plantas, entretanto, poucos observam a possível ação desse efeito na morfologia celular de leveduras. Após termos o indício de que a fração ativa F2 contendo catequina e flavonoides possa atuar na parede celular das leveduras, nosso estudo, buscou elucidar as possíveis alterações decorrentes desse efeito, na morfologia dos isolados de *C. glabrata*.

Estruturalmente, a parede da célula fúngica é composta por uma rede complexa de proteínas e polissacarídeos, que variam sua composição dependendo da espécie fúngica. A interrupção desta matriz pode resultar em uma parede celular defeituosa, tornando-a susceptível à lise osmótica (Yen & Chang, 2008). Segundo De Groot et al. (2008), a parede celular de *C. glabrata* contém 6% de proteína (mananas e glucanas), e 1,3 % de quitina, possuindo os mesmo constituintes básicos da parede celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, porém, em quantidades diferentes. Por conter 6% de proteínas, a parede celular de *C. glabrata* é 50 % mais espessa do que a parede de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Tal fato poderia dificultar a penetração intracelular de fármacos antifúngicos.

A análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), realizada em nosso trabalho, comprovou que a fração ativa F2, exerce sua ação sobre a parede celular dos isolados de *C. grabrata* testados. Entre os isolados que puderam ser observados microscopicamente, cinco demonstraram deformações em suas paredes celulares, formando cavidades em sua superfície, e, alterações em sua morfologia, quando comparados ao formado apresentado pela cepa controle ATCC 40039. A cepa ATCC 40039 também foi avaliada quanto ao efeito da fração ativa F2, não apresentando deformações em sua parede celular, porém, foi observada a presença de várias cicatrizes de reprodução, indicando que a cepa estaria com altas taxas de reprodução, tentando sobreviver. As concentrações utilizadas de fração ativa F2 para análise em MEV variaram entre (3,91 - 62,5 µg/mL), visto que cada isolado apresentou um valor para a CIM₅₀. Esse efeito, como visto anteriormente, possivelmente é decorrente da combinação de substâncias que estariam presentes na fração ativa F2, como a catequina e flavonoides.

O mecanismo exato de ação da fração ativa F2 que acarreta em desestabilização da parede celular em alguns isolados, ainda não foi elucidado.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados avaliados podemos concluir que:

- ✓ A análise de compostos fenólicos nas frações F1, F2 e F3, juntamente com as substâncias de referências, demonstrou a presença de catequina na composição das mesmas.

✓ Na avaliação dos demais picos cromatográficos das frações F1, F2 e F3 através dos seus espectros de absorção no UV, foi observada a possível presença de compostos fenólicos e flavonoides, porém, esses compostos não foram elucidados neste estudo.

✓ São necessários estudos mais aprofundados que possam determinar a identidade dos demais picos cromatográficos presentes nas frações F1, F2 e F3.

✓ As frações F1, F2, F3, F4 e F6, demonstraram serem ativas contra os isolados resistentes de CNA.

✓ As frações ativas F1, F2 e F3, comparadas as demais, possuíram maior eficácia frente a todas as espécies testadas.

✓ A fração ativa F2 indicou ser a fração mais eficaz comparada a fração F1 e F3, destacando valores baixos e satisfatórios para a sua CIM, tanto para isolados sensíveis como para isolados resistentes de *C. glabrata*.

✓ *Candida glabrata* foi a espécie mais susceptível às frações, apresentando os menores valores de CIM.

✓ A atividade antifúngica das frações ativas F1, F2 e F3 possivelmente é devida à interação de substâncias presentes nessas frações, como catequina, flavonoides e compostos fenólicos.

✓ A interação entre a fração ativa F2 e o FLZ apresentou atividade sinérgica satisfatória em 80 % dos isolados de *C. glabrata* testados. Com isso, foi possível comprovar que quando duas substâncias são combinadas, seus efeitos podem ser potencializados.

- ✓ A presença de catequina e possivelmente de flavonoides na fração ativa F2, poderia facilitar a penetração do FLZ no interior da célula fúngica, aprimorando seu efeito sobre os isolados testados.
- ✓ Não foram observados efeitos sinérgicos na combinação da fração ativa F2 e AND.
- ✓ O possível mecanismo de ação da fração ativa F2 ocorre na parede celular dos isolados de *C. glabrata*, comprovado através de alterações morfológicas visualizadas na parede celular desses isolados, observadas em MEV.

7. PERSPECTIVAS

Há uma necessidade atualmente em descobrir novas substâncias que possuam eficácia antifúngica contra leveduras emergentes oportunistas (CNA), responsáveis pelo elevado índice de infecções como candidíases e candidemias, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. As CNA são de extrema importância clínica, pois apresentam maior resistência à terapia antifúngica convencional. A prospecção de novas biomoléculas se torna de imensa relevância com o intuito de superar o desenvolvimento dessa resistência. No presente estudo, as frações obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado de *A. sellowiana*, demonstraram atividade antifúngica contra isolados resistentes de CNA. A fração ativa F2, além de possuir maior eficácia antifúngica, interagiu de maneira sinérgica quando combinada ao FLZ. Como consequência, formulações desenvolvidas a partir de derivados de *A.*

sellowiana, podem se tornar promissoras quando utilizadas isoladamente ou em associação com antifúngicos sintéticos.

A partir dos resultados de nosso trabalho, diversos outros estudos podem ser realizados:

Avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade da fração ativa F2 contendo catequina, através do Ensaio Cometa verificando o possível dano causado ao DNA das células, e toxicidade desta fração ativa.

Investigar a susceptibilidade da fração ativa F2 contendo substâncias como catequina e flavonoides a outras espécies de CNA. Essa investigação sendo satisfatória poderia aumentar o espectro de ação de uma possível formulação contendo a fração ativa F2.

Caracterizar os demais picos cromatográficos identificados nas frações ativas F1, F2 e F3, investigando suas possíveis funções biológicas.

Caracterizar o mecanismo exato de ação da fração ativa F2 na parede celular das leveduras de CNA, identificando seu alvo específico de ação e também outros possíveis mecanismos envolvidos na inibição do crescimento dessas leveduras, utilizando ensaios com enzimas específicas.

Determinação da interação da fração ativa F2, com antifúngicos pertencentes a outras classes como a 5-FC, e ANF, que também são utilizados para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp.

Avaliar se a combinação da fração ativa F2 com o FLZ também demonstra efeitos sinérgicos em ensaios *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS

ADEBAJO, C.; OLOKI, K.J.; ALADESANMI, A.J. Antimicrobial activity of the leaf and extract of *Eugenia uniflora*. **Phytotherapy Research**, v. 36, p. 258-259, 1989.

AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 48, p. 80- 86, 2013.

AHMED, A.S.; ELGORASHI, E.E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four south African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.

ALVES, I.A.; BANDEIRA, L.A.; MARIO, D.A.N.; DENARDI, L.B.; NEVES, L.V.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. **Mycopathologia**, v. 174, p. 215-221, 2012.

ARAÚJO, A.A.; SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.R.A.; NETO, M.A.S.; DA SILVA, G.R.; DE ARAÚJO JR, F.R. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.

ARIF, T.; MANDAL, T.K.; DABUR, R. Natural products: Anti - fungal agents derived from plants. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 283–311, 2011.

BADDLEY, J.W.; PAPPAS, P.G. Antifungal combination therapy - Clinical potential. **Drugs**, v. 65, p. 1461-1480, 2005.

BARROS, F.M.C.; PIPPI, B.; DRESCH, R.R.; DAUBER, B.; LUCIANO, S.C.; APEL, M.A.; FUENTEFRIA, A.M.; POSER, G.L.V. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 294-299, 2013.

BASILE, A.; VUOTTO, M. L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO-COBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, p. 199-203, 1997.

BASILE, A.; CONTE, B.; RIGANO, D.; SENATORE, F.; SORBO, S. Antibacterial and Antifungal Properties of Acetonic Extract of *Feijoa sellowiana* Fruits and Its Effect on *Helicobacter pylori* Growth. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 1, p. 189-195, 2010.

BESHEY, B.N.; OKASHA, A.S.; ELDIN, M.E.N. Fluconazole and selective digestive decontamination for prevention of *Candida* infection in high risk critically ill patients. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 50, p. 93-98, 2013.

BHATNAGAR, A., SHARMA, P.K., KUMAR, N. A Review on "Imidazoles": Their Chemistry and Pharmacological Potentials. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 3, n. 1, p. 268-282, 2011.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; BELLIS, F.D. CONTE, M.; MINICHELLO, A.; MANZO, F.; CARAFA, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S.; COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; DE LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, AM. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1902-1914, 2007.

BRAUTASET, T.; SLETTA, H.; NEDAL, A.; BORGOS, S.E.F; DEGNES, K.F.; BAKKE, I.; Volokhan, O.; Sekurova, O.N.; Treshalin, I.D.; Mirchink, E.P.; Dikiy, A.; Ellingsen, T.E.; Zotchev, S.B. Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*. **Chemistry & Biology**, v. 15, p.1198-1206, 2008.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 351–358, 2014.

BUTTS, A.; KRYSAN. J.D. Antifungal drug discovery: something old and something new. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. 1002870, 2012.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M., VIUDES, A., ESPINEL-INGROFF, A. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* Species determined by *Checkerboard*, time-kill, and etest methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1593–1596, 2005.

CHAHOUD, J.; KANAFANI, Z.A.; KANJ, S.S. Management of candidaemia and invasive candidiasis in critically ill patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 29-35, 2013.

CHANDER, J. Emergence of antifungal resistance and resistant *Candida* Species in Health-care Setups. **Journal of Patient Safety & Infection Control**, v. 1, n. 1, p. 22-24, 2013.

CHEEWANGKOON, R.; GROENEWALD, J.Z.; SUMMERELL, B.A.; HYDE, K.D.; TO-ANUN, C.; CROUS, P.W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**, v. 23, p. 55-85, 2009.

CHIOU, C.C.; MAVROGIORGOS, N.; TILLEM, E.; HECTOR, R.; WALSH, T.J. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 3310-3321, 2001.

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.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition. CLSI Document M27-S4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L.F.A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M.J.C.; DA CUNHA, C.A.; YASUDA, M.A.S.; MORETTI, M.L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 283-312, 2013.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, n. 5, 2010.

DA COSTA, V.G.; QUESADA, R.M.B.; ABE, A.T.S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, v. 178, p. 243–250, 2014.

DA SILVA, C.R.; NETO, J.B.A.; SIDRIM, J.J.C.; ÂNGELO, M.R.F.; MAGALHÃES, H.I.F.; CAVALCANTI, B.C.; BRILHANTE, R.S.; MACEDO, D.S.; DE MORAES, M.O.; LOBO, M.D.; GRANGEIRO, T.B.; JÚNIOR N.H.V. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.

DA SILVA, C.R.; NETO, J.B.A.; CAMPOS R.S.; FIGUEIREDO, N.S.; SAMPAIO, L.S.; MAGALHÃES, H.I.; CAVALCANTI, B.C.; GASPARG, D.M.; DE ANDRADE, G.M.; LIMA, I.S.; VIANA, G.S.B.; DE MORAES, M.O.; LOBO, M.D.;

GRANGEIRO, T.B.; JÚNIOR, H.V.N. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468-1478, 2014.

DANIELLI, L.J.; REIS, M.; BIANCHINI, M.; CAMARGO, G.S.; BORDIGNON S.A.L., GUERREIRO, I.K.; FUENTEFRIA, A.; APEL, M.A. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 23-28, 2013.

DANNAOUI, E. Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2013, n. 450, p. 71 - 77, 2013.

DEÁK, T. *Candida* and related genera. In: C. de W. Blackburn (Ed.), **Food Spoilage Microorganisms**. Woodhead Publishing, Cambridge, 2006. p. 336–353.

DE GROOT, P.W.J.; KRANEVELD, E.A.; YIN, Q.Y.; DEKKER, H.L.; GROß, U.; CRIELAARD, W.; DE KOSTER, C.G.; BADER, O.; KLIS, F.M.; WEIG, M. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1951-1964, 2008.

DENNING, D.W.; HOPE, W.W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.

DIDOMENICO, B. Novel antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 509-515, 1999.

DINIZ, D.N.; MACÊDO-COSTA, M.R.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIRA, J.V.; HIGINO, J.S. Efeito antifúngico *in vitro* do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* Berg. sobre micro-organismos orais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, p. 151-156, 2010.

DOMINGUES, E.A.; NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, M.C.; TEIXEIRA, T.S.; PEIXOTO, J.L.B.; SARRAGIOTTO, M.H.; VIDOTTI, G.J. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 1, p. 23-27, 2010.

DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.

EPSTEIN, J.B. Diagnosis and treatment of oropharyngeal candidiasis. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics**, v. 15, p. 91-102, 2003.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PEREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, E. In vitro activity of echinocandins against non-*Candida albicans*: Is echinocandin antifungal activity the same? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 2, p. 3-9, 2011.

FARIA, N.C.G.; KIM, J.H.; GONÇALVES, L.A.P.; MARTINS, M. de L.; CHAN, K.L.; CAMPBELL, B.C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 506-513, 2011.

FERREIRA, P.S.; MORAIS, S.R.; BARA, M.T.F.; CONCEIÇÃO, E.C.; PAULA, J.R.; CARVALHO, T.C.; VAZ, B.G.; COSTA, H.B.; ROMÃO, W.; REZENDE, M.H. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FERREIRÓS, M.P.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, J. Update on the treatment of superficial mycoses. **Actas Dermo - Sifiliográficas**, v. 103, n. 9, p. 778-783, 2012.

FLORENT, M.; NOEL, T.; RUPRICH-ROBERT, G.; DA SILVA, B.; FITTON-OUHAB, V.; CHASTIN, C.; PAPON, N.; CHAPELAND-LECLERC, F. Nonsense and Missense Mutations in FCY2 and FCY1 Genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2982-2990, 2009.

FRAGA, H.P.F.; AGAPITO-TENFENA, S.Z.; CAPRESTANO, C.A.; NODARIA, R.O.; GUERRA, M.P. Comparative proteomic analysis of off-type and normal phenotype somatic plantlets derived from somatic embryos of *Feijoa (Acca sellowiana)* (O. Berg) Burret). **Plant Science**, v. 210, p. 224-231, 2013.

GADKARI, P.V.; BALARAMANA, M. CATECHINS: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122-138, 2015.

GAITÉN, Y.I.G.; MARTÍNEZ, M.M.; HENRIQUES, A.T.; ALONSO, G.B. Flavonoids analysis of a butanol fraction obtained from *Phyllanthus orbicularis* HBK. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 44, n. 3, p. 367-373, 2010.

GIANNINI, P.J.; SHETTY, K.V. Diagnosis and management of oral *Candidiasis*. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 44, n. 1, p. 231-240, 2011.

GIMENO-CARPIO, E. Tratamiento tópico de las micosis cutáneas superficiales. **Medicina Clínica**, v. 126, n. 1, p 43-46, 2006.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da Candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GONZÁLEZ, J.C.M.; GONZÁLEZ, M.C.; GIL, C.L. Utilidad clínica de la anidulafungina en el tratamiento de las candidiasis esofágicas, candidemias y candidiasis invasoras. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 107-118, 2008.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 327-345, 2010.

GROLL, H.A. Efficacy and safety of antifungals in pediatric patients. **Early Human Development**, v. 87, p. 71-74, 2011.

GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; MENDONÇA, J.S.; MARTINEZ, R.; BRITO, L.R.; SILVA, N.; MORETTI, M.L.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A.L. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with *Candidemia*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 442 -447, 2012.

HA, J.F.; ITALIANO, C.M.; HEATH, C.H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F.M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p. 181-195, 2011.

HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 733-738, 2007.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 225-229, 2004.

HOLUB, B. S.; RAUCHA, I.; RADNER, S.; SPERL, W.; HELL, M.; KOFLEK, B. Effects of galanin message-associated peptide and neuropeptide Y against various non-albicans *Candida strains*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 76–80, 2011.

JOHNSON, M.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.; REX, J. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 693-715, 2004.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal

agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 5678–5698, 2012.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

LAPČÍK, O.; KLEJDUS, B.; KOKOŠKA, L.; DAVIDOVÁ, M.; AFANDI, K.; KUBÁŇ, V.; HAMPL, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 983-992, 2005.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; KLEPSE, M.E. Comparison of Etest, *checkerboard* dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345-351, 2002.

LI, L.; DING, H.; WANG, B.; YU, S.; ZOU, Y.; CHAI, X.; WU, Q. Synthesis and evaluation of novel azoles as potent antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 192-194, 2014.

LIU, S.; HOU, Y.; CHEN, X.; GAO, Y.; LI, H.; SUN, S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 395-402, 2014.

LOCKHART, S.R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131-136, 2014.

LYON J.P.; MOREIRA L.M.; CARDOSO, M.A.G.; SAADE J.; RESENDE M.A. Antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. oral isolates obtained from denture wearers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 668-672, 2008.

MARTINS, N.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; CARVALHO, A.M.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Plants used in folk medicine: The potential of their hydromethanolic extracts against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 62-67, 2015.

MAYR, A.; AIGNER, M.; LASS-FLÖRL, C. Anidulafungin for the treatment of invasive candidiasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n. 1, p. 1-12, 2011.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B.C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 25, p. 136-144, 1996.

MCMANUS, B.A.; COLEMAN, D.C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 166-178, 2014.

MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

MOHAMMADI, H.A.; IMANI, N.S.; AMROLLAHI, H. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. **Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. 1-8, 2014.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, p. 254-259, 2014.

MORAES, R.C.; DALLA LANA, A.J.; KAISER, S.; CARVALHO, A.R.; DE OLIVEIRA, L.F.S.; FUENTEFRIA, A.M.; ORTEGA, G.G. Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. against resistant non-albicans *Candida* isolates. **Industrial Crops and Products**, v. 69 p. 7-14, 2015.

MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; GIMENEZ-MARTINEZ, R.; NAVARRO-ALARCON, M.; RUFÍAN-HENARES, J.A. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 19-26, 2015.

MORII, D.; SEKI, M.; BINONGO, J.N.; BAN, R.; KOBAYASHI, A.; SATA, M. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, p. 558-562, 2014.

MOTOHASHI, N.; KAWASE, M.; SHIRATAKI, Y.; TANI, S.; SAITO, S.; SAKAGAMI, H.; KURIHARA, T.; NAKASHIMA, H.; WOLFARD, K.; MUCSI, I.; VARGA, A.; MOLNÁR, J. Biological activity of *Feijoa* peel extracts. **Anticancer Research**, v. 20, 6B, p. 4323-4329, 2000.

MUZYKA, B.C.; EPIFANIO, R.N. Update on Oral Fungal Infections. **Dental Clinics of North America**, v. 57, p. 561–581, 2013.

NAKASHIMA, H. Biological activity of *Feijoa* peel extracts. Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands. **Occasional Papers**, v. 34, p.169-75, 2001.

NAKAYAMA, H.; UENO, K.; UNO, J.; NAGI, M.; TANABE, K.; AOYAMA, T.; et al. Growth defects resulting from inhibiting ERG20 and RAM2 in *Candida glabrata*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 317, n.1, p. 27-33, 2011.

NATHAN, W.; FLECKMAN, P.; HUANG, J.I. Fungal Nail Infections. **The Journal of Hand Surgery**, v. 39, n. 5, p. 985-988, 2014.

NOËL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 173-178, 2012.

NYILASI, I.; KOCSUBÉ, S.; KRIZSÁN, K.; GALGÓCZY, L.; PESTI, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. In vitro synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, p. 175-184, 2010.

OLIVA, M.M.; GALLUCCI, M.N.; CAREZZANO, M.E.; DEMO, M.S. Natural Products as Alternative Treatments for *Candida* Species Resistant to Conventional Chemotherapeutics. **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components**, n. 4, p. 31-43, 2013.

OLIVEIRA, P.M.; MASCARENHAS, R.E.; LACROIX, C.; FERRER, S.R.; OLIVEIRA, R.P.C.; CRAVO, E.A.; ALVES, A.P.; GRASSI, M.F. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 239-244, 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 65-70, 2008.

PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K.; KARAMITALAB, M.; JAFARI, M.; TARAZ, H.; EBRAHIMI H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 23, n. 2, p. 113-118, 2013.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M.; SPILIOPOULOU, A.; FLIGOU, F.; MANOLOPOULOU, P.; SPILIOPOULOU, I.; VRETTOS, T.; DODOU, V.; FILOS, K.S., ANASTASSIOU, E.D.; MARANGOS, M.; CHRISTOFIDOU, M. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection with *Candida* isolation and selection of non-*albicans* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 3, p. 227-232, 2014.

PARK, B.J.; PARK J-C.; TAGUCHI, H.; FUKUSHIMA, K.; HYON, TAKATORI, K.; Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, p. 401-405, 2006.

PARK, B.J.; CHILLER, T.M.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Epidemiology of systemic fungal diseases: an overview. In: KAUFFMAN, C.A.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J.D.; DISMUKES, W.E. **Essentials of Clinical Mycology**. Nova lorque: Springer, 2011, p. 27-37.

PEMÁN, J.; SALAVERT, M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v. 31, n. 5, p. 328-341, 2013.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 108-117, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M.C.; BROWN, S.D.; LOCKHART, S.R.; MOTYL, M.; PERLIN, D.S. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164-176, 2011.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. 3-13, 2012.

PIPPI, B. **Avaliação da capacidade de Candida Parapsilosis e Candida Glabrata desenvolverem resistência fenotípica á Própolis Vermelha Brasileira e ao fluconazol e avaliação de sua atividade antifúngica em associação com fluconazol e anidulafungina**. 2014. 145 f. (Dissertação Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PIPPI, B.; LANA, A.J.D.; MORAES, R.C., GÜEZ, C.M.; MACHADO, M.; DE OLIVEIRA, L.F.S.; LINO VON POSER, G.; FUENTEFRIA, A.M. *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015.

PROIA, L.A. New Antifungal Therapies. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 28, n. 22, p. 169–173, 2006.

QUINDÓS, G. Epidemiología de la candidemia y la candidiasis invasiva. Un rostro en continuo cambio. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

RAMOS, L.S.; BARBEDO, L.S.; BRAGA-SILVA, L.A.; SANTOS, A.L.S.; PINTO, M.R.; D.B.G.; SGARBI. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2014.

RIBEIRO, M.A.; PAULA, C.R. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 71-75, 2007.

ROETZER, A.; GABALDON, T.; SCHULLE, C.; From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, p. 1-9, 2011.

ROGERS, T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact ? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 7-11, 2006.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALENZANO, L.; MALLAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v.15, p. 635-638, 2008.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* (O.Berg). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2947-2951, 2004.

SAHU, J.K.; GANGULY, S.; KAUSHIK, A. Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, p. 456-465, 2013.

SAITO, H.; TAMURA, M.; IMAI, K.; ISHIGAMI, T.; OCHIAI, K. Catechin inhibits *Candida albicans* dimorphism by disrupting Cek1 phosphorylation and cAMP synthesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 56, p. 16-20, 2013.

SALAS, P.M.; CÉLIZ, G., GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S.L. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1411-1415, 2011.

SANITÁ, P.V.; PAVARINA, A.C.; MACHADO, A.L. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Oral Endodontology**, v. 116, n. 5, p. 562-569, 2013.

SANTOS, C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases**, v. 71, n. 3, p. 304-308, 2011.

SANTOS, K.L.; PERONI, N.; RUBENS, R.P.G; NODARI, O. Traditional knowledge and management of *Feijoa (Acca sellowiana)* in Southern Brazil. **Economic Botany**, v. 63, n. 2, p. 204-214, 2009.

SARAIVA, R.M.C. **Atividade Antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. 2012. 96 f. (Dissertação Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

SARDI, J.C.O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J.S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SAUSEN, T.L.; LÖWE, T.R.; FIGUEIREDO, L.S.; BUZATTO, C.R. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* dc. e *Acca sellowiana* (O.Berg) burret. **Polibotânica**, v. 27, p. 145-158, 2009.

SCHUSTER, M.G.; MEIBOHM, A.; LLOYD, L.; STROM, B. Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: A matched, case-control study. **Journal of Infection**, v. 66, p. 278-284, 2013.

SEMIS, R.; MENDLOVIC, S.; POLACHEK, I.; SEGAL, E. Activity of an Intralipid formulation of nystatin in murine systemic candidiasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 336-340, 2011.

SEREFHANOGLU, K.; TIMURKAYNAK, F.; CAN, F.; CAGIR, U.; ARSLAN, H.; OZDEMIR, F.N. Risk factors for candidemia with non-*albicans* *Candida* spp. in intensive care unit patients with end-stage renal disease on chronic hemodialysis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, n. 6, p. 325-332, 2012.

SERPA, R.; FRANÇA, E.J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C.G.T.J.; DINIZ, A.; FURLANETO, M.C. *In vitro* antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1704-1708, 2012.

SGANGA, G.; PEPE, G.; COZZA V.; NURE, E.; LIROSI, M.C.; FRONGILLO, F.; GROSSI, U.; BIANCO, G.; AGNES, S. Anidulafungin - A new therapeutic option for *Candida* infections in liver transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 44, n. 7, p. 1982-1985, 2012.

SHALINI, K.; KUMAR, N.; DRABU, S.; SHARMA, P.K. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, p. 668-677, 2011.

SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R.; YALFANI, R. Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 114, n. 2, p. 158-159, 2011.

SILVA, S.M.F.Q.; PINHEIRO, S.M.B.; QUEIROZ, M.V.F.; MARIA PRANCHEVICIUS, M.C.; CASTRO, J.G.D.; PERIM, M.C.; CARREIRO, S.C. *In vitro* activity of crude extracts of two plant species in the Cerrado on yeast of the *Candida* SPP variety. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1649-1656, 2012.

SINGH, H.P.; KAUR, S.; NEGI, K.; KUMARI, S.; SAINI, V.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT- Food Science and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2012.

SPADER, T.B.; VENTURINI, T.P.; ROSSATO, L.; DENARDI, L.B.; CAVALHEIRO, P.B.; BOTTON, S.A.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 3, p. 200-204, 2013.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; RAMASUBRAMANIAN, A.K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies | Drug resistance**, v. 11, 2014.

STAPLETON, P.D.; SHAH, S.; HAMILTON-MILLER, J.M.; HARA, Y.; NAGAOKA, Y.; KUMAGAI, A. UESATO, S., TAYLOR, P.W. Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 4, p. 374–380, 2004.

STEIER, Z.; VERMITSKY, J.P.; TONER, G.; GYGAX, S.E.; EDLIND, T.; KATIYAR, S. Flucytosine antagonism of azole activity versus *Candida glabrata*: role of transcription factor Pdr1 and multidrug transporter Cdr1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5543-5547, 2013.

TIPHINE, M.; LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transplant Infectious Disease**, v. 1, p. 273-283, 1999.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. - emerging pathogens? **Mycoses**, v. 5, p. 24-32, 2012.

TORO, M.; TORRES, M.J.; MAITE, R.; AZNAR, J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 418-424, 2011.

TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466-479, 2007.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

VARADE, R.S.; BURKEMPER, N.M. Cutaneous fungal infections in the elderly. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 29, n. 2, p. 461-478, 2013.

VELURI, R.; WEIR, T.L.; BAIS, R.P.; STERMITZ, F.R.; VIVANCO, J.M. Phytotoxic and antimicrobial activities of Catechin Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1077-1082, 2004.

VUOTTO, M.L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; SOLE, P.D.; CASTALDO-COBIANCHI, R. LAGHI, E.; IELPO, M.T.L. Antimicrobial and antioxidant

activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 197-201, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd. Ed. Berlin: Springer, 1996. 384p.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, p. 97-110, 2009.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the *Feijoa* (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, p. 923-926, 2010.

YEN, T.; CHANG, S. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 232-236, 2008.

ZHANG, L.; SHE, X.; MERENSTEIN, D.; WANG, C.; HAMILTON, P.; BLACKMON, A.; Hu, H.; CALDERONE, R.; LI, D. Fluconazole resistance patterns in *Candida* species that colonize women with HIV infection. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 76, p. 84-89, 2014.

ZOGHBI, M.G.B.; GUILHON, G.M.S.P.; SARGES, F.N.; PEREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 660-665, 2011.

ZORE, G.B.; THAKRE, A.D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S.M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p.1181-1190, 2011.