

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO ANTIMICÓTICA DA FRAÇÃO RICA EM SAPONINAS OBTIDA  
DO FRUTO DE *Ilex paraguariensis* (Auguste de Saint-Hilaire)**

FERNANDA ÉMELI KLEIN SILVA

PORTO ALEGRE – RS, BRASIL.

MARÇO DE 2014.

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

**AVALIAÇÃO ANTIMICÓTICA DA FRAÇÃO RICA EM SAPONINAS OBTIDA  
DO FRUTO DE *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.)**

FERNANDA ÉMELI KLEIN SILVA  
(LICENCIADA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

PORTO ALEGRE – RS, BRASIL.

MARÇO DE 2014.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de chegar até aqui, de viver para aprender e pelas orações atendidas. Aos meus pais, José Fernando Silva e Isaltina Augusta Klein da Silva por cuidarem de mim, por serem solidários ao meu compromisso, pelo apoio as minhas escolhas e por questioná-las também. Por serem exemplos de humildade e virtude.

Agradeço ao meu grande companheiro, namorado e amigo Luis Gustavo Perotto Correa, pelo carinho diário, por toda a compreensão, por “acreditar no meu potencial”, e escutar tantas vezes que depois do mestrado seria possível.

Aos meus orientadores Alexandre M. Fuentefria e George G. Ortega agradeço pelo conhecimento intelectual e humano, pela confiança, e pela amizade. A todos os demais professores do FAR03, e ao diretor da Faculdade de Farmácia José Ângelo Zuanazzi agradeço pelo apoio e as colaborações.

Aos meus avós, pelo carinho e admiração, que é recíproco, pelos genes da pesquisa e por compartilharem o meu entusiasmo. A minha sogra Iria Perotto pelo acolhimento carinhoso e pelas belíssimas frases de bom dia, assim como o restante da família Perotto Correa.

A minha irmã Shamla, pelo companheirismo e o privilégio de trilhamos juntas a academia e a mana Babi por topar as brincadeiras de bióloga. As minhas tias Gládis e Carin pelas indagações científicas com tom de brincadeira. Ao meu tio Everton pela infância repleta de teorias provadas e contestadas, por apresentar-me o termo hipótese, e a minha prima Camila por simplesmente sempre poder contar com ela. Silvana e Jean agradeço pela força.

A todos os amigos dentro e fora da Universidade. Agradeço aos colegas de laboratório, principalmente as “micogirls” que se tornaram mais que colegas, se tornaram amigas de verdade: Line (além de toda a amizade, de tornar meu dia mais divertido, ela ainda dá risada quando eu imito ela); Brunita (porque ela é parceira pra tudo, tornou isso tudo mais fácil); Vanessita (porque ela abraça com um carinho e sempre traz café da manhã); E com igual carinho eu agradeço a Rê, Camilinha, Dai, Thayse, a minha querida I.C. Bruna Pires, a Gabizita, e a Bruna Casanova.

A todos os colegas de trabalho, em especial a Simone, o Carlos, a Rosana, a Geni, a Maristela, o Gilson e o Marquinhos pela parceria e descontração. Aos alunos e professores do LDG (em especial a Vanessa Pitol) e as minhas amigonas do IPCT, todas! Ao Gregory pela grande ajuda na microscopia.

Agradeço a Ervateira Barão, ao PPGMAA, a Faculdade de Farmácia, a UFRGS e aos órgãos de fomento, Capes, CNPq e Fapergs pelo grande apoio a realização deste projeto.

# AValiação antimicótica da fração rica em saponinas obtida do fruto de *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.)<sup>1</sup>

Autor (a): Fernanda Émeli Klein Silva

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria

Co-orientador (a): Prof. Dr. George G. Ortega

## Resumo

*Ilex paraguariensis* é uma importante planta nativa da América do Sul, popularmente conhecida como mate, cujas folhas são tradicionalmente consumidas na forma de infusão. Muitos benefícios à saúde são mencionados para a utilização de seus constituintes, entre eles as saponinas. Várias propriedades farmacológicas são atribuídas as saponinas. No mate, o maior teor delas ocorre nos frutos imaturos. Os fungos promovem sérias micoses invasivas em indivíduos com a saúde comprometida. Sendo assim, este trabalho objetiva avaliar o potencial antimicótico do extrato aquoso e de uma fração purificada de saponinas, ambos obtidos de frutos verdes do mate, frente aos principais fungos causadores de micoses. Visa também o estudo da associação entre a fração de saponinas e o fluconazol. Inicialmente foram avaliadas quanto à susceptibilidade 16 espécies, entre fungos leveduriformes e filamentosos. Nove *Candida* spp. foram selecionadas para os estudos de CIM, de associação por *Checkerboard* e pela metodologia de superfície de resposta, e por fim para pesquisa do mecanismo de ação. As espécies de *Candida* foram mais sensíveis a associação da fração de saponinas com fluconazol, que aos mesmos isoladamente. A associação foi capaz de reverter à resistência ao fluconazol em alguns isolados. Os testes de mecanismo de ação revelaram variações entre os isolados, não sendo possível afirmar apenas um mecanismo geral de ação da combinação. Ensaio microscópico revelou um predomínio do brotamento e a presença de um material viscoso em torno das leveduras, enquanto que o ergosterol exógeno revelou a possibilidade de interação com as saponinas, interferindo na atividade antifúngica.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (80p.) Março, 2014.

## ANTIMYCOTIC EVALUATION OF *Ilex paraguariensis* FRUITS'S SAPONINS RICH FRACTION<sup>2</sup>

Author: Fernanda Émeli Klein Silva

Supervisor: Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria

Co-supervisor: Prof. Dr. George G. Ortega

### Abstract

*Ilex paraguariensis* is an important native plant from South America, generally known as Yerba Mate, which is traditionally consumed as an infusion made from the leaves. Many health benefits have been mentioned for the use of its constituents, including the saponins. Several pharmacological properties are attributed to the saponins, where it's highest content can be found in mate green fruits. The fungi promote serious invasive mycoses in individuals with compromised health. Thus, this study aims to evaluate the antifungal potential of the crude extract and the purified saponins fraction, both obtained from unripe mate fruits, in the treatment of mycoses causing fungi. It also aims evaluate the antifungal association of saponins fraction and fluconazole. At first were evaluated the susceptibilities of 16 species, including yeasts and filamentous fungi. Nine *Candida* spp. were selected for the studies of minimal inhibitory concentration, association assay, checkerboard, response surface methodology, and finally to investigate the antifungal action mechanism. *Candida* species were more susceptible to the fraction of saponins more fluconazole, than the neat substances. Their association was able to reverse fluconazole resistance in some isolates. The mechanism of action assays revealed variations between the isolates, then, it was not possible to explain a general mechanism of action for this antifungal activity. Microscopic studies demonstrated a predominance of buds and a viscous liquid around the cells. Furthermore, exogenous ergosterol showed the possibility of interaction with saponins, interfering antifungal activity.

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Enviroment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (80p.) March, 2014.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS-----	viii
LISTA DE FIGURAS-----	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS -----	x
1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. Objetivo geral -----	3
1.2. Objetivos específicos -----	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	4
2.1. <i>Ilex paraguariensis</i> (A. St. - Hil.) -----	4
2.1.1. Aspectos etnobotânicos-----	4
2.1.2. Aspectos químicos -----	5
2.1.3. Aspectos biológicos -----	7
2.1.4. Atividade antimicrobiana -----	8
2.2. Micoses-----	9
2.2.1. Epidemiologia das infecções causadas por <i>Candida</i> spp. -----	10
2.3. Avaliação da atividade antifúngica -----	13
2.3.1. Associação de fármacos -----	15
2.3.2. Associação de produtos naturais e fármacos-----	17
2.4. Determinação do mecanismo de ação antifúngico -----	18
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	20
3.1. Cepas fúngicos -----	20

3.2. Agentes antifúngicos-----	20
3.3. Fração enriquecida de saponinas do fruto do mate-----	21
3.4. <i>Screening</i> da atividade antifúngica-----	21
3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição -----	22
3.6. Método colorimétrico - MTT -----	23
3.7. Associação entre a fração purificada de saponinas do fruto do mate e o fluconazol -----	23
3.7.1. <i>Checkerboard</i> -----	23
3.7.2. Metodologia de superfície de resposta (MSR) -----	24
3.7.3. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) -----	25
3.8. Mecanismo de Ação-----	25
3.8.1. Ensaio de proteção osmótica por sorbitol -----	25
3.8.2. Efeito da adição de ergosterol-----	25
3.8.3. Microscopia eletrônica de varredura -----	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	27
4.1. <i>Screening</i> da atividade antifúngica-----	27
4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição e confirmação pelo método colorimétrico utilizando MTT ----	29
4.3. Associação entre MSF e FCZ por <i>Checkerboard</i> -----	32
4.4. Associação entre MSF e FCZ pela metodologia de superfície de resposta (MSR) -----	34

4.5. Ensaio de proteção osmótica por sorbitol. -----	44
4.6. Ensaio de adição do ergosterol (ERGO)-----	44
4.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)-----	48
5. CONCLUSÕES -----	52
6. REFERÊNCIAS-----	55

## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 <i>Screening</i> da atividade antifúngica para a fração de saponinas do fruto do mate (MSF) e o extrato aquoso do fruto do mate (EAFM).....	28
TABELA 2 Quadro comparativo do dano celular superior a 50% ou 80% promovido pela fração purificada de saponinas do fruto do mate (MSF) e pelo fluconazol (FCZ) sem associação. ....	31
TABELA 3 Concentrações da associação de MSF e FCZ promotoras de inibição total do crescimento celular para os isolados leveduriformes, por <i>Checkerboard</i> e o cálculo do ICIF .....	33
TABELA 4 Modelo seguido pelo software para a montagem das combinações aleatórias da fração de saponinas e do fluconazol, no estudo de associação, pelo desenho de poço central (DPC).....	35
TABELA 5 Efeitos estimados (E) pelo desenho de poço central (DPC), sobre a associação da fração saponosídica e o fluconazol no tratamento das leveduras.....	39
TABELA 6 Concentração inibitória mínima da associação da fração de saponinas e o fluconazol, na ausência e presença de 0,8 M de sorbitol (SBT) .....	44
TABELA 7 Concentração inibitória mínima da anidulafungina, na ausência e presença de 0,8 M de sorbitol.....	44
TABELA 8 Cruzamentos realizados no ensaio de adição do ergosterol, utilizando quatro diferentes concentrações de ergosterol, cruzadas frente a 9 misturas de FCZ e MSF, respectivamente.....	45

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 <i>Ilex paraguariensis</i> , folhas e frutos imaturos.....	05
FIGURA 2 Alvos da terapia antifúngica.....	18
FIGURA 3 Microplaca do estudo de associação por <i>Checkerboard</i> da <i>Candida tropicalis</i> CT72A .....	34
FIGURA 4 Gráficos de contorno referentes ao dano celular gerado pelo estudo de associação entre a fração saponosídica e o fluconazol.....	36
FIGURA 5 Gráficos de contorno representando a porcentagem de dano celular pela intensidade de cor da área gráfica, conforme legenda, pela utilização das combinações de MSF e FCZ na presença das concentrações de ergosterol e na ausência.....	47
FIGURA 6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do isolado de <i>C. tropicalis</i> CT72A.....	49
FIGURA 7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do isolado de <i>C. Krusei</i> ATCC 6258.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A: Absorbância

ADF: Anidulafungina

ANF: Anfotericina B

ATCC: *American Type Culture Collection*

ASD: Agar Sabouraud Dextrose

CFM: Concentração fungicida mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CNA: *Candida* não-albicans

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTHT: Células-tronco humanas transplantadas

DPC: Desenho de poço central

E: Efeitos estimados

EAFM: Extrato Aquoso do Fruto do Mate

ERGO: Ergosterol

FCZ: Fluconazol

Fig: Figura

°C: Graus Celsius

h: Horas

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

m: Mutante

mg: Miligrama

mL: Mililitros

mM: Milimolar

min: Minutos

MOPS: Ácido 3 – (N-morfolino-propanosulfônico)

MSF: Fração purificada de Saponina do Fruto do Mate

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromide

n: Número

OMS: Organização Mundial de Saúde

pH: Potencial Hidrogeniônico

R: Resistente

RBEC: Rede Brasileira de Estudos em Candidemia

RPMI: Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

S: Susceptível

SBT: Sorbitol

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento das micoses fúngicas de caráter invasivo e também superficial revelam problemáticas desde o seu diagnóstico, o qual pode depender de muito tempo e exigir profissionais especializados. Se incluída a resistência microbiana aos antifúngicos disponíveis envolvendo bloqueio ou perda de função dos mesmos, as chances de controle destes micro-organismos diminuem.

Os antifúngicos já descobertos controlam uma parte das micoses fúngicas, diminuindo a sua eficácia em casos clínicos que apresentam isolados resistentes e multirresistentes. Pacientes imunodeprimidos também são vítimas de uma resposta terapêutica tardia e, por ser um grupo mais sensível, maior é a exigência de uma terapia fungicida, que não esteja apenas ancorada ao sistema imune para erradicar o micro-organismo. Para estes casos, a solução que poderia vir de uma associação medicamentosa, nem sempre é possível.

A semelhança constitucional entre uma célula fúngica e as células humanas restringem e diminuem o número de alvos nestas células, eliminando uma série de compostos sintéticos ou biomoléculas antifúngicas oriundas de produtos naturais devido à alta toxicidade em células humanas.

Faz-se necessário, portanto, o estudo de substâncias capazes de cooperar com os antifúngicos já em uso e, além disso, melhorar o seu uso, contribuindo para o controle das micoses.

A natureza fornece uma riqueza de compostos bioativos, capazes de fornecer proteção e tratar muitas doenças causadas pelos fungos. As infusões de *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.), popularmente conhecida como mate, estão difundidas mundialmente e aliadas à saúde humana. Entretanto, pouco se conhece a respeito das potenciais propriedades medicinais de seu fruto.

A escolha pela fração rica em saponinas, neste estudo, deve-se às características encontradas neste grupo, como a boa solubilidade em água, e uma série de relatos na literatura sobre a atividade antifúngica de saponinas similares, obtidas de outras fontes vegetais. Além disso, o fruto do mate, que é considerado um subproduto da indústria ervateira, é colhido e descartado ainda imaturo para processamento das folhas, o que justifica a sua utilização na pesquisa.

### **1.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial antifúngico da fração rica em saponinas obtidas do fruto imaturo de *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.), frente as espécies de *Candida*.

### **1.2. Objetivos Específicos**

A - Avaliar o perfil de susceptibilidade de um grupo de isolados fúngicos patogênicos, frente ao extrato aquoso e a fração enriquecida de saponinas obtidos dos frutos imaturos do mate;

B - Avaliar o resultado da associação entre a fração de saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* e o fluconazol no controle de crescimento dos fungos sensíveis e resistentes ao antifúngico;

C - Investigar em um estudo de associação, qual componente, se a fração saponosídica ou o fluconazol é que tem maior efeito *in vitro* na promoção do dano celular às leveduras do gênero *Candida*.

D - Propor um ou mais mecanismos de ação na célula fúngica para a associação saponina-fluconazol.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.)

#### 2.1.1. Aspectos Etnobotânicos

A família Aquifoliacea, compreende três gêneros, sendo o de maior importância econômica o gênero *Ilex*. *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.), uma das espécies vegetais que o gênero abriga, utilizada para a produção de erva mate e seus derivados, é nativa da América do Sul (Mosimann et al., 2006). É uma árvore perene e dióica que alcança cerca de quinze metros de altura. Esta apresenta folhas alternadas, simples, geralmente estipuladas, variando de subcoriáceas a coriáceas, ligeiramente obtusas no vértice, ou mesmo arredondadas (Figura 1). As flores são hermafroditas, pequenas, brancas e pouco vistosas, apresentam também inflorescências que nascem sobre os ramos florais envelhecidos (Schultz, 1985). O período de floração ocorre de setembro a dezembro, enquanto a frutificação acontece no período de dezembro a abril. O fruto é uma baga-drupa globular, em geral com quatro sementes, medindo de seis a oito milímetros, de cor verde, quando não maduro, passando a vermelho arroxeado e violáceo quando maduro (Figura 1) (Da Silva, 2007).

O Brasil é o segundo maior produtor da espécie, perdendo apenas para a Argentina. Paraguai e Uruguai, também contribuem significativamente para esta produção, que tem seu valor estimado em \$1 bilhão de dólares em todo o mundo, em uma estimativa realizada em 2004 (Hech & De Mejia, 2007).



**FIGURA 1:** *Ilex paraguariensis*, folhas e frutos imaturos, imagem adaptada de Hech & De Mejia, 2007.

### 2.1.2. Aspectos Químicos

A técnica empregada na análise e o material analisado podem resultar em diferenças significativas dos componentes do mate, principalmente os mais facilmente detectados, como a cafeína (Choi et al., 2005). Os metabólitos presentes nas folhas e frutos do mate também podem sofrer variação sazonal, alterando, por exemplo, os níveis encontrados de metilxantinas (Schubert et al., 2006). Entretanto, extratos aquosos oriundos das partes aéreas de *Ilex paraguariensis*, costumam conter teores elevados de compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas (Cardozo Jr. et al., 2007; Strassmann et al., 2008). Contudo, é no fruto imaturo do mate onde ocorrem os maiores teores de saponinas (Taketa et al., 2004; Pavei et al., 2007; Borré et al., 2010; Peixoto et al., 2010).

Dos metabólitos secundários presentes no mate, os mais abundantes são os compostos fenólicos. Os ácidos cafeolquínicos, como o ácido clorogênico, são comumente encontrados em altas concentrações no extrato aquoso, e este dado tem sido relacionado à alta capacidade antioxidante do mate. (Bravo et al., 2007; Hech & De Mejia, 2007). Além destes, são comuns os flavonóides rutinas e quercetinas (Filip et al., 2001).

Metilxantinas são substâncias orgânicas, de origem vegetal, que contém um grupo amina. Entre as mais encontradas no mate podemos citar, em ordem de maior concentração, cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), e teofilina (1,3-dimetilxantina), isômero da teobromina que aparece em pequenas quantidades (Cardozo Jr. et al., 2007).

As saponinas, moléculas de caráter anfifílico, possuem um esqueleto lipofílico, que pode ser do tipo esteróide (exclusivamente presente nas angiospermas, monocotiledôneas) ou triterpênico (principalmente encontrado nas angiospermas dicotiledôneas), e uma porção hidrofílica que possui diferentes açúcares e/ou ácidos urônicos relacionados. Sua estrutura anfipática é responsável pelas características detergente, emulsionante e formadora de micelas (Sparg et al., 2004). As saponinas de *Ilex paraguariensis* podem ser distinguidas das demais, por apresentarem agliconas derivadas somente do ácido ursólico e oleanólico (Pires et al. 1997).

Descobertas das possíveis interações com as células de seres vivos têm despertado interesse na utilização das saponinas como agente antifúngico (Woldemichael & Wink, 2001; Francis et al., 2002; Zhang et al., 2006) e como

facilitadora da permeação pela membrana plasmática, aumentando a chance da chegada de um fármaco aos alvos intracelulares (Haraguchi et al., 1999; Weng et al. 2012).

### **2.1.3. Aspectos Biológicos**

Muito difundido na América do Sul pelas características biológicas, cerca de 1 litro do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* é consumido por dia, por milhares de pessoas, constituindo a principal alternativa ao uso de chá e café (Mosimann et al., 2006).

A informação a respeito das propriedades biológicas do mate é vasta, e os seus benefícios são cada vez mais numerosos. Entre elas: a atividade anti-obesidade, relacionada à diminuição dos triglicerídeos e do colesterol (Balzan et al., 2013); para o Diabetes tipo II (Kanz et al., 2012), através da prevenção de hiperglicemias (Pereira, et al., 2012). A atividade anti-obesidade é também descrita para a fração de saponinas purificadas dos frutos do mate (De Resende et al., 2012). De acordo com De Mejia et al., em 2005, o chá do mate é capaz de inibir a proliferação celular de carcinoma oral, e tem sua ação mediada pelos flavonóides. Da mesma forma, sua função protetora da hemólise das células vermelhas do sangue, induzida pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), é principalmente atribuída aos flavonóides, como o ácido clorogênico e a cafeína. (Peralta et al., 2013). *Ilex paraguariensis* é ainda relacionada a benefícios como a alta capacidade antioxidante (Berté et al, 2011), diurética, e estimulante do sistema nervoso central (Gonzalez et al. 1993).

#### 2.1.4. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do gênero *Ilex* é comumente atribuída aos triterpenos. Triterpenos isolados do fruto de *Ilex integra*, espécie distribuída na China, Japão e Taiwan, inibiram o crescimento de bactérias e fungos *in vitro* (Haraguchi et al., 1999). Triterpenóides isolados de plantas do gênero *Ilex* também apresentaram atividade tripanossomicida (Taketa et al., 2004) e anti-*Trichomonas vaginalis* (Rocha et al., 2012).

O extrato aquoso do mate apresentou atividade antifúngica frente à *Malassezia furfur* na dose de 1000 mg/mL (Fillip et al., 2010) e atividade antiviral, em concentração livre de citotoxicidade, sob o Herpes Vírus Simples Tipos 1 e 2 (Lückemeyer et al., 2012). O extrato de mate obtido pelo método do fluido supercrítico foi testado na faixa de 6,25 até 100 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo-se valores de inibição próximos aos causados por 30 µg de vancomicina, 1 µg de oxacilina e 10 µg de gentamicina (Carelli et al., 2011). Nesta mesma faixa de concentração, um segundo estudo utilizando extratos hidro-etanólicos das folhas e dos ramos do mate demonstraram atividade frente às bactérias dos gêneros *Proteus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, principalmente o extrato obtidos dos ramos (De Biase et al., 2009).

Em relação à toxicidade, a fração enriquecida de saponinas do mate (MSF) se mostrou muito pouco citotóxica para as hemácias sanguíneas (Verza, 2011), assim como para as células de rim bovinas (Treter et al., 2010). Da mesma forma se comportaram as infusões de *Ilex paraguariensis* no Ensaio de micronúcleo, não apresentando toxicidade genética para linfócitos humanos

(Alves et al., 2008) e ainda prevenindo o estresse oxidativo em monócitos e macrófagos em estudo *in vivo* (Fernandes et al., 2012).

## **2.2. Micoses**

As micoses podem ser divididas em superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas. A micose é denominada superficial, quando o micro-organismo coloniza o estrato córneo da pele e/ou seus anexos, como pêlos e unhas, bem como os cabelos, e as mucosas, oral e genital em menor extensão. Na maioria das vezes, a micose superficial não desencadeia a indução de uma resposta inflamatória e pode ser originada por fungos da microbiota normal, como *Malassezia furfur*, ou do ambiente, como *Piedraia hortae*. (Somenzi et al., 2006). A micose cutânea é representada principalmente pelos fungos queratinofílicos, que utilizam a queratina como nutriente, durante a infecção da pele, do cabelo ou da unha. Os três gêneros que melhor representam este grupo, também chamados dermatófitos são *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), somente este grupo de micro-organismos acomete 25% da população mundial (Peres et al., 2010). Nas micoses subcutâneas, o fungo é inoculado abaixo da epiderme, atingindo a derme e causando infecções que podem se espalhar ou permanecer no sítio. A enfermidade mais comum no Brasil é a esporotricose, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenki*, e relacionada, principalmente à atividade agrícola ou outros trabalhos envolvendo a manipulação do solo e dos vegetais (Barros et al., 2010). Nas micoses sistêmicas há um predomínio das formas pulmonares e cutaneomucosas, que podem espalhar-se para outros órgãos, afetando principalmente indivíduos com

alterações na imunidade, o que tem levado a um recente aumento na incidência deste tipo de infecção (Galimberti et al., 2012). A micose do tipo oportunista, também ocorre a partir de um desequilíbrio na homeostase do indivíduo, favorecendo a colonização por um fungo da própria flora, e assim desencadeando a doença. Estes dois últimos tipos de micose, sistêmica e oportunista, se confundem muito, pois ambas podem acarretar no surgimento uma da outra. São comuns em ambas as infecções a presença dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus* (Romani, 2011).

### **2.2.1. Epidemiologia das infecções causadas por *Candida* spp.**

Entre os exemplos supracitados, as micoses oportunistas têm assumido maior importância, devido ao aumento do seu grupo de risco, que inclui portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), receptores de órgãos sólidos ou de células-tronco humanas transplantadas (CTHT), prematuros, pacientes com doenças hematológicas malignas, queimados e pacientes de internação médica prolongada (Warnock, 2007). Dentre estes, destaca-se o HIV, que teve grande contribuição para o aumento das infecções fúngicas invasivas. Até a difusão da terapia antirretroviral nos países desenvolvidos, mais de 80% das pessoas infectadas pelo HIV desenvolviam candidíase mucocutânea, e este crescimento se manteve nos países em desenvolvimento (Warnock, 2007).

Micoses deste tipo apresentam padrões de incidência regionais distintos, principalmente para àquelas adquiridas do ambiente, separando, por exemplo, a América Latina de outras partes do mundo (Nucci et al., 2010). Enquanto nos EUA a incidência da *C. glabrata* é alta nos casos de candidemia, no Brasil, ela

representa apenas 4,9% dos casos, em comparação às demais espécies, índices semelhantes aos encontrados em países como Argentina e Chile (Colombo et al., 2006). No hemisfério norte a candidemia causada por *C. parapsilosis* é prevalente em neonatos; diferente da América Latina onde a espécie está distribuída entre todas as idades (Nucci et al., 2010).

Grupos de risco afetados por infecções invasivas podem alterar o perfil dos agentes envolvidos. Enquanto recipientes de órgãos-sólidos transplantados são principalmente atingidos pelo gênero *Candida* (53%), seguido por *Aspergillus* (19%) e *Cryptococcus* (8%) (Pappas et al., 2010), os receptores de CTHT encontram-se mais comumente acometidos pela aspergilose invasiva (43%) que pela candidíase (28%) (Kontoyiannis et al., 2010). Espécies de *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. e os Zigomicetos, que comumente não eram isoladas em infecções fúngicas invasivas, hoje tem ocasionado este tipo de enfermidade (Fridkin, 2005).

A candidíase constitui a principal causa das micoses oportunistas no mundo, sendo vista como um problema de saúde pública persistente (Pfaller & Diekema, 2007). A rede brasileira de estudos em candidemia (RBEC) reporta 1,38 casos para cada 1000 admissões hospitalares (Nucci et al., 2013). Há mais de 200 espécies de *Candida* descritas, no entanto apenas algumas têm causado doenças humanas. Mais de 95% de todas as infecções sanguíneas por *Candida* (candidemia, forma mais comum de apresentação clínica das candidíases invasivas) do mundo, são originadas por cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Colombo et al., 2006; Ortega et al., 2011).

Embora as espécies isoladas apresentem certa variação determinada pelas características geográficas e demográficas, a *C. albicans* permanece predominante nos casos de candidemia no mundo, e como o principal agente das candidemias da América Latina (Nucci et al., 2013). No Brasil, do mesmo modo, a RBEC afirma que a *C. albicans* representa 40,5% dos casos de candidemia, seguida por *C. parapsilosis* 25,8%, *C. tropicalis* 13,2%, *C. glabrata* 10% e *C. krusei* 4,7% (Nucci et al., 2013). As espécies de *C. albicans* contam ainda com seu caráter de virulência que as permite crescer sob a forma arredondada de blastoconídio ou formando pseudo-hifas. A produção dessas estruturas aumenta a sua capacidade de aderência e facilita a sua invasão e disseminação pelo corpo do hospedeiro, através do aumento da superfície de contato com o mesmo (Giolo & Svidzinski, 2010).

Entretanto, há um aumento no número de isolados de *Candidas* não-*albicans* (CNA) causando doenças invasivas (Low & Rotstein, 2011). *Candida tropicalis*, segundo agente etiológico mais freqüente nas candidemias latino americanas, tem sido isolada principalmente nos grupos de receptores de CTHT e com malignidades hematológicas (Colombo et al., 2006). *Candida parapsilosis*, terceira mais comum causa das candidemias na América Latina, apresenta baixa resistência microbiológica ao fluconazol (FCZ), assim como a *C. tropicalis*. Ao contrário da *C. glabrata*, a qual é mais susceptível e por esta razão mais aplicada a utilização das equinocandinas (Low & Rotstein, 2011). Difere também da *C. krusei*, representada por espécies intrinsecamente resistentes ao fluconazol (Nucci et al., 2013).

A resistência microbiológica é definida como a ausência de susceptibilidade *in vitro* de um micro-organismo para um fármaco antimicrobiano, no qual a CIM do fármaco exceda os *breakpoints* de susceptibilidade para aquele organismo (Tobudic et al., 2012). A maioria dos mecanismos de resistência em *Candidas* resulta de mutações pontuais em enzimas alvo ou genes reguladores (Bondaryk et al., 2013). Em parte, a alta taxa de resistência aos antifúngicos azólicos é devido ao tratamento da candidíase com base no uso extensivo do fluconazol, na década de 90, que acarretou na seleção de espécies de *Candida* menos susceptíveis ou resistentes (Sanglard & Odds, 2002). Até 2002, o panorama de resistência ao fluconazol entre as espécies causadoras da candidíase somavam mais de 75% dos isolados de *C. krusei*, 35% de *C. glabrata*, 10–25% de *C. tropicalis* e *C. lusitanae* (Krcmery & Barnes, 2002). Por outro lado, dois relatos dizem não ter encontrado relação entre exposição prévia ao FCZ e o desenvolvimento da candidemia (Lin et al., 2005; Shorr et al., 2007).

### **2.3. Avaliação da Atividade Antifúngica**

Apesar da melhoria na terapia antifúngica nos últimos trinta anos, o fenômeno da resistência é ainda de grande importância na prática clínica (Vandeputte et al., 2012). O aumento do conhecimento alcançado a cerca das bases moleculares da resistência, viabilizando determiná-las e assim ajustar um tratamento adequado, não impediu o crescimento do espectro de resistência à terapia antifúngica (Rogers, 2006).

Diante da possibilidade de infecções por estes patógenos e as limitações para o uso dos fármacos, como o seu alto custo e os efeitos indesejáveis, e

ainda o surgimento de resistência, algumas substâncias de origem natural têm sido apontadas como possibilidade de tratamento, haja vista sua reconhecida atividade antifúngica (Fenner et al., 2005; Schmourlo et al., 2005). A informação quanto ao uso etnofarmacológico da flora é de grande importância para a descoberta de novas propriedades antifúngicas nas plantas. As chances de se encontrar plantas ativas frente a pelo menos uma espécie fúngica aumentam significativamente, quando comparadas às demais, escolhidas de forma aleatória (Svetaz et al., 2010). Além disso, a atividade farmacológica da flora latino-americana é muito rica, comparada às demais regiões do mundo. Em um estudo que envolveu 117 espécies da Amazônia, o principal uso medicinal destas espécies incluía doenças dermatológicas, seguida por distúrbios gastrointestinais, urinários e respiratórios (Breitbach et al., 2013).

Entretanto, o caminho para a descoberta de novos fármacos é um processo demorado. São necessários aproximadamente doze anos, desde a síntese de um novo fármaco até a prescrição farmacêutica, chegando a custar cerca de 231 milhões de dólares, na América (Vagelos, 1991). Além disso, a aplicação do teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro*, para a pesquisa clínica e para a orientação da terapia antifúngica, ainda enfrenta muitos problemas quanto à reprodutibilidade. Esta é uma das razões da criação de comitês, como o norte americano *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Entre as suas proposições está a padronização dos testes de susceptibilidade antifúngica para fármacos, com o objetivo de diminuir os efeitos dentro e entre os laboratórios, permitindo assim a correlação de dados de relevância clínica (Cormican & Pfaller, 1996). O mesmo serve ainda como

modelo às avaliações de atividade antifúngica de produtos naturais (Lima et al., 2011; Marcos-Arias et al., 2011).

### **2.3.1. Associação de Fármacos**

Em vista da dificuldade de prospecção de novos antifúngicos eficazes e, sobretudo seguros, o estudo de associação de fármacos já disponíveis com compostos ou moléculas inéditas vem se expandindo há pelo menos duas décadas (Espinel-Ingroff, 2009). A combinação na terapia antifúngica pode trazer resultados importantes como a potencialização da ação farmacológica (sinergismo); a expansão do espectro de ação, incluindo os isolados resistentes; a prevenção da resistência emergente; e a diminuição da dose administrada, podendo minimizar os efeitos indesejáveis (Baddley & Pappas, 2005).

A combinação *in vitro* entre os antifúngicos anfotericina B e flucitosina, por exemplo, têm demonstrado pelo menos um efeito de aditividade frente as leveduras (Baddley & Pappas, 2005). Porém, a associação entre azóis e flucitosina foram menos satisfatórios, resultando geralmente em indiferença ou antagonismo (Ghannoum et al., 1995; Siau & Kerridge, 1999; Lewis et al., 2002). Para o tratamento *in vivo* de um modelo animal de candidíase invasiva, a combinação de fluconazol e anfotericina B foi tão efetiva quanto o uso de anfotericina B isoladamente, mas melhor que o uso do fluconazol sozinho (Sugar et al., 1995).

Além da associação estrita entre antifúngicos, para alcançar uma maior atividade, é possível também, por exemplo, combinar um antimicótico a outro

fármaco não antifúngico, mas que seja capaz de promover uma diminuição da metabolização deste pelo organismo humano. Isto resulta em uma maior concentração efetiva do fármaco e possivelmente maior eficácia (Gupta et al., 1999).

Antimicóticos que atuam por mecanismos diferentes, quando associados, podem favorecer ou prejudicar a ação de apenas um dos componentes dessa associação. Um exemplo é a flucitosina, que associada a anfotericina B tem sua absorção celular aumentada pela ação da segunda droga, atingindo níveis de concentração intracelular maiores (Espinel-Ingroff, 2009). Por outro lado, a anfotericina B associada a antifúngicos azólicos, que agem pela inibição da síntese do esterol de membrana, pode resultar em uma atividade antifúngica antagônica pela perda de sítios de ligação provenientes desta inibição (Sugar, 1995). Contudo, a combinação destes dois antifúngicos traz relatos controversos. Trabalhos com a utilização deles em associação também demonstram igual, ou melhor, ação anticandidal (Ghannoum et al., 1995; Sanati et al., 1997; Rex et al., 2003)

Além do antagonismo ocasional, outras desvantagens podem resultar da utilização da combinação de fármacos antifúngicos. A associação de dois ou mais fármacos, pode aumentar a chance de reações adversas. Além disso, muitas opções reunidas podem resultar no mesmo que apenas uma efetiva. Não menos importante, esta é uma prática que pode trazer à tona a falsa certeza de se poder controlar qualquer patógeno (Vazquez, 2007).

### 2.3.2. Associação de Produtos Naturais e Fármacos

Assim como a combinação entre fármacos, substâncias naturais de diversas origens, incluindo plantas e os micro-organismos, estão em constante avaliação da sua capacidade antifúngica de forma isolada ou associada, com o objetivo de controlar os agentes micóticos emergentes (Faria et al., 2011; You et al., 2013; Zeidler et al., 2013).

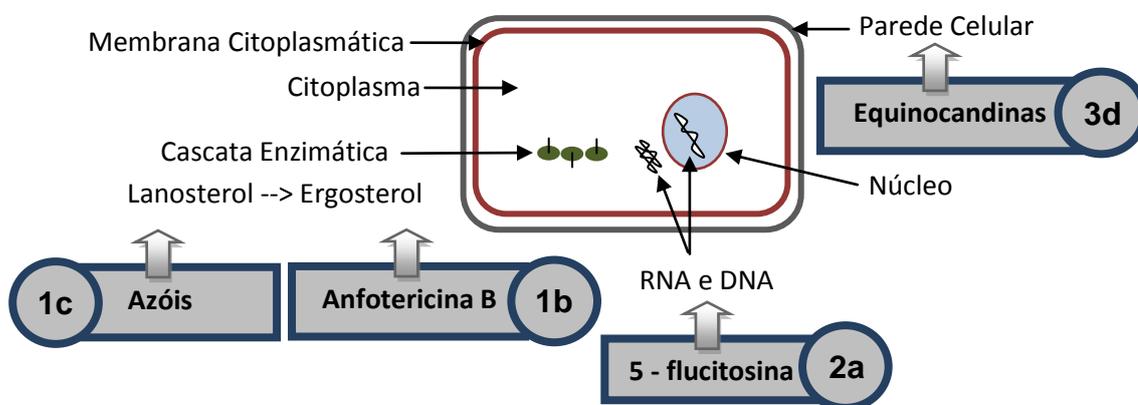
Apesar de o fluconazol ser comumente utilizado clinicamente (Brion et al., 2007), algumas características o tornam alvo de interações realizadas *in vitro* (Huang et al., 2008; Iwazaki et al., 2010) com o intuito de potencializar sua ação antifúngica. A primeira delas é a possibilidade de algumas espécies fúngicas, quando tratadas com o fluconazol apresentarem o fenômeno de arraste (*trailing*), que refere-se a um crescimento residual, observado após uma inibição visual primária, se mantida a cultura microbiana (Dornelas-Ribeiro et al., 2012). Por esta razão, pacientes tratados somente com este fármaco e debilitados imunologicamente podem apresentar recidiva. É também comum, o uso do FCZ em caráter profilático, aumentando o risco da colonização de isolados resistentes e dose-dependentes para este fármaco (Brion et al., 2007).

Huang e colaboradores, em 2008, demonstraram melhor atividade antifúngica para os isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, a partir da sua associação com baicalena, componente majoritário da erva chinesa *Scutellaria baicalensis*. Da mesma forma, a combinação entre punicalagina, composto antifúngico obtido dos frutos de *Punica granatum*, e fluconazol revelou melhor ação antimicótica frente à *Candida* spp., comparada ao efeito dos componentes testados isoladamente (Endo et al., 2010). Iwazaki e

colaboradores, em 2010, observaram a eliminação do arraste celular, quando associado ao fluconazol, o alcalóide berberine, extraído de ervas medicinais.

#### 2.4. Determinação do Mecanismo de Ação Antifúngico

A terapia antifúngica atualmente se baseia em três principais alvos de inibição: (1) Síntese e ligação do ergosterol, (2) ácidos nucleicos e/ou proteínas e (3) síntese da parede celular (Figura 2) (Kathiravan et al., 2012). Além disso, apenas quatro classes moleculares que visam três diferentes vias metabólicas fúngicas são utilizadas hoje essencialmente para tratar infecções fúngicas sistêmicas: Análogos de (a) fluopirimidinas, (b) polienos, (c) azóis e (d) equinocandinas (Vandeputte et al., 2012). Portanto, as metodologias utilizadas nos estudos de mecanismo de ação também se baseiam nestes princípios.



**FIGURA 2.** Principais alvos da terapia celular antifúngica por azólicos, poliênicos, nucleosídeos e candinas.

O estudo da membrana celular envolve a pesquisa da manutenção da sua funcionalidade durante a exposição ao agente antifúngico, bem como da sua estrutura. Duas maneiras de avaliação da integridade da membrana celular podem ser a visualização por microscopia de transmissão e a utilização de

marcadores específicos que penetram por membranas danificadas (Endo et al., 2010; Silva et al., 2011). Além disso, a determinação da possibilidade de ligação de moléculas antifúngicas ao ergosterol, lipídeo de grande importância para a formação da membrana citoplasmática, pode ser facilmente detectada pela adição do esterol na presença do agente ativo (Escalante et al., 2008). Outra possibilidade seria realizar a quantificação do esterol de membrana na presença e ausência do tratamento *in vitro* (Arthington-Skaggs et al., 2000; Cabral et al., 2013).

A observação da parede celular das leveduras tratadas pode ser realizada fazendo uso de concentrações sub-inibitórias da substância antifúngica seguida de visualização por microscopia eletrônica de varredura (Endo et al., 2010). A manutenção de protoplastos fúngicos pela adição do sorbitol é mais uma alternativa para a determinação do mecanismo de ação na parede celular. Quando visualizada a alteração da concentração inibitória mínima, na presença da substância osmorreguladora, é bem provável que o dano a parede celular esteja ocorrendo (Frost et al., 1995).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Cepas Fúngicas

As cepas fúngicas foram obtidas da Micoteca do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Inicialmente 16 espécies foram avaliadas para atividade antifúngica, envolvendo fungos filamentosos e leveduriformes, causadores de diferentes tipos de micose. Posteriormente, nove isolados de *Candida* que apresentaram algum tipo de susceptibilidade foram mantidos no estudo. Entre estes isolados, de origem clínica e/ou linhagens de referência, se encontram: *C. krusei* (ATCC 6258, CK01, CK02, CK05), *C. parapsilosis* (RL11m, RL13m, RL27m), *C. albicans* (CA76A) e *C. tropicalis* (CT72A).

#### 3.2. Agentes Antifúngicos

Fluconazol, anidulafungina (ADF) e anfotericina B foram adquiridas na forma de pó (Crystalia, Brasil) e dissolvidas em água destilada para preparo das soluções. Cada solução estoque foi mantida a -20 °C até seu uso.

### 3.3. Fração Enriquecida de Saponinas do Fruto do Mate

Os frutos imaturos foram cedidos gentilmente pela Ervateira Barão (Barão de Cotegipe, RS, Brasil) em janeiro de 2012. Eles foram secos a 35 °C por 72 h em um forno de ventilação forçada (Memmert, Alemanha) e a seguir macerados com uma solução de etanol 40% durante 40 min. Posteriormente, foi realizada uma extração por turbólise (IKA T-25 básico, Alemanha) durante 15 min, sob aquecimento. Depois, o extrato foi filtrado e concentrado até a metade do seu volume original sob vácuo em um rota-evaporador (Büchi R114) e por fim liofilizado (Edwards, EUA). A fração rica em saponinas (MSF) foi obtida do extrato liofilizado por extração de fase sólida (Diaion HP-20, Supelco, EUA) em um gradiente metanol-água. As saponinas foram então recuperadas nas frações contendo 70 e 90% de metanol (v/v) e depois de liofilizadas, foram misturadas.

### 3.4. *Screening* da Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica para as 16 espécies deste estudo foi determinada a partir de um *screening*, que avaliou o potencial antimicótico da MSF e do extrato aquoso do fruto do mate (EAFM), ambos na concentração de 500 ug/mL. Para a obtenção de células viáveis, os isolados foram crescidos em Agar Sabouraud contendo cloranfenicol 0,04% a 32 °C por 48 h se leveduriformes e por 7 dias se filamentosos. Tomando-se como referencial, o método de microdiluição, seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2008, documento M27-A3), a partir de uma cultura pura leveduriforme de 24 horas, foi preparado um inóculo equivalente a turbidez de 0,5 na escala de MacFarland o que corresponde a 10<sup>6</sup> células por

mililitro. Em seguida foi realizada diluição 1:50 em salina e a partir desta, outra diluição 1:20 em caldo Sabouraud, para obtenção do inóculo de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células por mililitro (2x concentrado). Para preparo da suspensão de conídios dos fungos filamentosos, o tapete crescido no tubo inclinado foi coberto por aproximadamente 1 mL de solução salina estéril 0,9%. Este foi então cuidadosamente aspirado do Agar inclinado para um tubo estéril contendo a mesma solução salina, até alcançar uma transmitância de 85% o que corresponde a  $10^6$  células conidiais por mililitro, de acordo com as recomendações do documento M38-A2 (CLSI, 2008). A partir dessa alíquota, a suspensão padrão de conídios ou esporangiósporos foi agitada durante 15 segundos com vórtex e diluída 1:50 em caldo Sabouraud para obter o inóculo do teste duas vezes concentrado (de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL). Os testes foram desenvolvidos em duplicata, as microplacas incubadas a 32 °C durante 48 h (para leveduras) e 72 h (para fungos filamentosos) e a leitura para determinação da atividade foi realizada visualmente, considerando a formação ou não de aglomerados de células (“botões”) no fundo da cavidade da placa.

### **3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Microdiluição**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de MSF e FCZ foi determinada pelo método da Microdiluição com algumas modificações, utilizando o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 meio contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio – Sigma, St. Louis, EUA – pH 7,0 com 0,165 mol/L de tampão MOPS – Sigma) (CLSI, 2008 e CLSI-S4, 2012). Para o teste, foram microdiluídos os compostos nas concentrações que variaram de 1,95 a 1000 µg/mL para MSF e 0,0625 a 32 µg/mL para FCZ. A CIM é definida como a

menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento visual do isolado fúngico em 48 h a 32 °C para a MSF, e de 50% para o FCZ. Contudo, foi observada também a inibição de 50% de crescimento para MSF e ainda de 80% para ambos. Os experimentos foram realizados em triplicata e as CIMs foram determinadas visualmente, e confirmadas com o auxílio do método colorimétrico, que utiliza o corante 3-(4,5-dimetil-2-thiazil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolio (MTT, Sigma, St. Louis).

### **3.6. Método Colorimétrico - MTT**

Depois de 48 h de incubação a 32 °C, os sobrenadantes da cultura celular foram descartados e as leveduras foram então incubadas por 3 h a 32 °C em uma suspensão contendo o MTT (2,5 mg de MTT em 50 ml de RPMI 1640). Após este período, foi realizada a remoção da suspensão, e os cristais de Formazan foram extraídos das células utilizando 200 µL de isopropanol (Merck). Do sobrenadante contendo o corante liberado foram recolhidos 150 µL e transferidos para uma nova microplaca. A absorbância (A) foi medida em um leitor de microplaca Envision (Perkin Elmer) com detecção em 570 nm da redução do MTT e em 690 nm do material plástico da microplaca, respectivamente. O percentual de dano celular foi calculado através da fórmula a seguir =  $1 - ([A_{570} -, A_{690} \text{ com o(s) fármaco}] / [A_{570} -, A_{690} \text{ sem o(s) fármaco}]) \times 100$ .

### **3.7. Associação entre a fração purificada de saponinas do fruto do mate e o fluconazol**

#### **3.7.1. Checkerboard**

Inicialmente, a associação entre fármaco e composto natural foi avaliada por *Checkerboard*, em duplicata, usando microplacas de 96 poços (Johnson et

al., 2004). Fluconazol e fração saponosídica foram dissolvidos em meio RPMI para obter quatro vezes a concentração teste. Fluconazol teve como maior concentração teste MICx8 (1024 µg/mL) e a Fração de Saponinas (1000 µg/mL). Assim, 50 µL de cada diluição do FCZ foram adicionados a microplacas de 96 poços na direção vertical, enquanto 50 µL de casa diluição da MSF foram adicionados na direção horizontal. O resultado é analisado visualmente e com o auxílio do cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), definido pela soma dos valores de CIM de cada substância em combinação, dividida pela CIM de cada substância sozinha. Um ICIF  $\leq 0,5$  é considerado sinergismo, entre 0,5 e 1 é aditividade, ICIF  $> 4$  é antagonismo e um resultado  $> 1$  mas  $\leq 4$  é considerado indiferente (Odds, 2003).

### **3.7.2. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)**

Depois de descoberta a atividade sinérgica pela técnica do *Checkerboard*, um estudo que avaliou o efeito estimado (E) na promoção do dano celular de MSF e FCZ foi desenvolvido pelo Desenho de Poço Central (DPC), delineado e analisado usando o *software* Statistica 8.0 (Tulsa, EUA). Neste estudo, treze combinações aleatórias das substâncias foram transferidas para as microplacas de 96 poços, em concentrações que variaram de 75 a 937 µg/mL para MSF e 1 a 37 µg/mL para FCZ, com cinco replicatas das concentrações centrais 500 µg/mL e 19 µg/mL, respectivamente. O preparo dos inóculos fúngicos e as condições de incubação seguiram as mesmas descrições das metodologias de microdiluição e *screening*.

### **3.7.3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Após determinação da inibição no ensaio de associação, os poços correspondentes as concentração inibitórias mínimas, dois poços antecessores de maior concentração, bem como os controles positivos de crescimento foram subcultivados em placas de Agar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol, desprovidas de qualquer antifúngico. Após 24 horas de incubação a 32 °C, as leituras da CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada a CFM como a menor concentração do fármaco capaz de impedir o crescimento visível do subcultivo.

## **3.8. Mecanismo de Ação**

### **3.8.1. Ensaio de Proteção Osmótica por Sorbitol**

Um ensaio de microdiluição envolvendo a associação de MSF e FCZ nas faixas de concentração de 1,95 a 1000 µg/mL e 0,0625 a 32 µg/mL, respectivamente, foi conduzido na ausência e presença de 0,8 mol/L de Sorbitol (Sigma, St. Louis, EUA), em triplicata (Frost et al., 1995). O sorbitol é um protetor osmótico usado para a estabilização dos protoplastos fúngicos. Microplacas de 96 poços foram incubadas a 32 °C e observadas em 2 e 7 dias. Um controle da técnica, utilizando anidulafungina, foi conduzido em paralelo. O preparo do inóculo seguiu a mesma descrição do ensaio de microdiluição. A CIM foi considerada a mais baixa concentração na qual não foi detectado crescimento visual.

### **3.8.2. Efeito da Adição de Ergosterol**

O dano celular da associação da fração saponosídica ao fluconazol foi medido na ausência e na presença de diferentes concentrações (50, 150 e 250

µg/mL) de ergosterol (Sigma, St. Louis, EUA) combinando os três fatores na mesma microplaca, utilizando o meio RPMI-MOPS (Escalante et al., 2008). O preparo do inóculo seguiu a mesma descrição do ensaio de microdiluição, exceto pela última diluição em RPMI, na qual foram produzidos quatro inóculos para cada isolado, três contendo ergosterol (50, 150 e 250 µg/mL) e um somente o meio de cultura. As microplacas foram incubadas em estufa a 32 °C por 48 h e a leitura foi conduzida pelo método colorimétrico, utilizando o MTT, conforme descrito na metodologia de microdiluição, em porcentagem de dano celular para os tratamentos.

### **3.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura**

As leveduras tratadas com MSF e FCZ, sozinhos e em associação, por 48 h, foram transferidas para lamínulas sobre a superfície de agar Sabouraud, sendo novamente incubadas a 32 °C, por 20 h. As células crescidas sobre a superfície da lamínula foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, *overnight*. A pós-fixação foi conduzida em tetróxido de ósmio 1% preparado em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) contendo 10 mM de cloreto de cálcio por 60 min, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram desidratadas gradualmente com acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha), secas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>, revestidas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS EVO 50).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Screening* da Atividade Antifúngica

A escolha da concentração de 500 µg/mL para o *screening* da atividade antifúngica foi baseada nos relatos da literatura, segundo os quais, extratos de origem natural avaliados têm demonstrado atividade na ordem de microgramas (Fenner et al., 2005; Alanís-Garza et al., 2007; López et al., 2011). Para esta concentração, em nenhum dos isolados testados foi observado uma inibição total, porém, visualmente se observou a redução do crescimento em alguns isolados, em comparação ao controle de crescimento (Tabela 1).

Ao extrato aquoso de *I. paraguariensis* foi previamente atribuída ação antifúngica para *Malassezia furfur* (Fillip et al., 2010) utilizando uma concentração de 1000 mg/mL, porém esta é uma concentração que poderia estar saturando o meio de cultura e impedindo a obtenção de água para o crescimento fúngico. No presente estudo não foi encontrada atividade antifúngica nas concentrações testadas do extrato do fruto de *Ilex paraguariensis* e da fração de saponinas. Considerando a inibição visual de 100% de crescimento, nem o EAFM, nem a MSF apresentaram o caráter antifúngico nas concentrações testadas.

**TABELA 1.** *Screening* da atividade antifúngica para a fração de saponinas do fruto do mate (MSF) e o extrato aquoso do fruto do mate (EAFM).

n	ESPÉCIE	MSF	EAFM
4	<i>Candida albicans</i>	> 500	> 500
4	<b><i>Candida glabrata</i></b>	<b>500</b>	<b>500</b>
2	<b><i>Candida krusei</i></b>	<b>500</b>	> 500
3	<i>Candida tropicalis</i>	> 500	> 500
3	<i>Candida parapsilosis</i>	> 500	> 500
2	<i>Geotrichum candidum</i>	> 500	> 500
2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	> 500	> 500
3	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	> 500	> 500
3	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	<b>500</b>	> 500
3	<i>Scytalidium dimidiatum</i>	> 500	> 500
3	<b><i>Epidermophyton floccosum</i></b>	<b>500</b>	<b>500</b>
2	<i>Microsporum canis</i>	> 500	> 500
2	<i>Microsporum gypseum</i>	> 500	> 500
2	<i>Fusarium solani</i>	> 500	> 500
2	<i>Pseudallescheria boydii</i>	> 500	> 500
1	<i>Acremonium nepalense</i>	> 500	> 500

n: Número de isolados testados de cada espécie.

Em negrito as espécies com redução de 50% do crescimento.

Concentração teste: 500 µg/mL.

Entre as espécies de *Candida glabrata*, *C. krusei*, *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*, algumas cepas apresentaram redução de 50% do

seu crescimento após tratamento com 500 µg/mL de MSF e EAFM. Ambos, EAFM e MSF apresentaram o mesmo perfil, pouco inibitório.

Outros relatos sobre a atividade antimicrobiana de extratos obtidos do mate foram demonstrados, porém em concentrações na ordem de miligramas por mL, superiores às testadas neste estudo. (De Biase et al, 2008; Carelli et al, 2011).

#### **4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Microdiluição e confirmação pelo Método Colorimétrico utilizando MTT**

Pela relevância anteriormente destacada do tema candidíase (Pfaller & Diekema, 2007), foram privilegiadas as espécies de *Candida* no estudo da CIM. A escolha dos isolados se deu a partir de estudos prévios do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, acolhendo espécies resistentes e sensíveis ao fluconazol. A fração rica em saponinas foi escolhida em virtude a sua pureza e melhor atividade, em comparação ao EAFM; enquanto que a decisão pelo fluconazol se deve aos problemas enfrentados por este antifúngico em seu uso clínico para tratamento das micoses causadas por *Candida* (Brion et al., 2007). Embora a purificação da amostra em um estudo de atividade biológica seja um caráter importante, que pode aproximar composto ativo e substrato alvo, um composto menos purificado pode também somar ações antifúngicas e ter melhor desempenho *in vitro* (Casaroto & Lara, 2010).

A tabela 2. apresenta um quadro comparativo entre os danos celulares sofridos pelas leveduras, no teste de microdiluição, após tratamento com MSF e FCZ, ambos confirmados pelo ensaio colorimétrico por MTT.

Os valores limites (*breakpoints*) adotados para determinação da susceptibilidade ao fluconazol foram os recomendados pelo documento M27-A3 (CLSI, 2008) e seu material suplementar mais atualizado, M27-S4, (CLSI, 2012). Apesar de dois isolados de *C. krusei* apresentarem inibição de 50% do seu crescimento celular com a concentração de 2 µg/mL de FCZ, o suplemento 4 da CLSI não determina breakpoint para esta espécie, sugerindo um fator de resistência intrínseca (CLSI, 2012). Entretanto, esse fator parece não estar sendo expresso em algumas das cepas testadas, a julgar pelos resultados. De acordo com estes documentos, as demais cepas de *Candida* testadas não foram susceptíveis ao fluconazol, considerando uma inibição inferior a 50% do crescimento celular em comparação ao controle sem o fármaco (CLSI M27-S4, 2012). Além disso, nenhuma sofreu dano celular superior a 80% para esta mesma faixa de concentração de fluconazol.

**TABELA 2.** Quadro comparativo do dano celular superior a 50% e 80% promovido pela fração purificada de saponinas do fruto do mate (MSF) e pelo fluconazol (FCZ), sem associação frente aos isolados de *Candida*.

<b>S ≤ 2 / R &gt; 4*</b>		<b>Dano Celular superior a 50%</b>		<b>Dano Celular superior a 80%</b>	
		<b>FCZ</b>	<b>MSF</b>	<b>FCZ</b>	<b>MSF</b>
<b>Concentração inibitória mínima (CIM)</b>					
<b>Micro-organismos</b>	<b>Origem</b>	<b>FCZ</b>	<b>MSF</b>	<b>FCZ</b>	<b>MSF</b>
<i>C. tropicalis</i> CT72A	Isolados clínicos	> 32	500	> 32	> 1000
<i>C. albicans</i> CA76A	Isolados clínicos	16	125	> 32	> 1000
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	ATCC	> 32	125	> 32	> 1000
<i>C. krusei</i> CK01	Isolados clínicos	8	125	> 32	250
<i>C. krusei</i> CK02	Isolados clínicos	2	500	> 32	1000
<i>C. krusei</i> CK05	Isolados clínicos	2	250	> 32	> 1000
<i>C. parapsilosis</i> RL11m	Ponta de cateter	> 32	125	> 32	> 1000
<i>C. parapsilosis</i> RL13m	Ponta de cateter	16	500	16	> 1000
<i>C. parapsilosis</i> RL27m	Ponta de cateter	> 32	> 1000	> 32	> 1000

\*S ≤ 2: CIM menor ou igual a 2 µg/mL de FCZ para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* denota susceptibilidade. R > 4: CIM maior que 4 µg/mL de FCZ para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* denota resistência (CLSI M27-S4, 2012). Faixa teste MSF: 1000 a 1,95 µg/mL. Faixa teste FCZ: 32 a 0,125 µg/mL.

Do tratamento com MSF, cinco dos isolados tiveram crescimento reduzido em mais de 50%, em concentrações inferiores a 500 µg/mL e dois sofreram dano celular superior a 80%, com até 1000 µg/mL de MSF (tabela 2).

Alguns autores descrevem como fortemente ativos, os compostos capazes de inibir o crescimento celular fúngico em concentrações equivalentes ou que variam de dez até cem vezes mais que as dos fármacos de utilização para as mesmas espécies (Navarro García et al., 2003; Sathiamoorthy et al., 2007; Lima et al., 2011).

Entre os cinco isolados que melhor responderam ao tratamento com MSF, consta um isolado de *C. albicans*, espécie predominante nos casos de candidemia no mundo (Warnock, 2007), e principal agente das candidemias da América Latina (Nucci et al., 2013).

Foram também parcialmente inibidos pelo tratamento com MSF três isolados de *C. krusei*, espécie comumente resistente ao fluconazol e um isolado de *C. parapsilosis*, segunda espécie mais freqüente nos casos de candidemia no Brasil (Nucci et al., 2013). Para dois isolados de *C. krusei* (CK01 e CK02), o tratamento com a fração de saponinas causou danos celulares superiores a 80%.

#### **4.3. Associação entre MSF e FCZ por *checkerboard***

Para avaliar a capacidade inibitória de MSF e FCZ em associação, foi conduzido um estudo como uma promissora estratégia de combate aos isolados de *Candida*. Sete isolados foram testados pelo método do *checkerboard*, e, complementarmente, pelo desenho de poço central, abrangendo os nove isolados leveduriformes. Os resultados são apresentados na tabela 3 e na figura 3, respectivamente.

A associação envolvendo produtos naturais antifúngicos tem sido comumente baseada pelo método *checkerboard* (Endo et al., 2010; Jin et al., 2010; Khan & Ahmad, 2011). Entretanto, este método se baseia no cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), o qual é definido pela soma dos valores de CIM de cada agente em combinação, dividida pela CIM de cada agente sozinho (Odds, 2003). Neste caso, na falta dos valores de CIM para cada componente individualmente, as maiores concentrações testadas foram as consideradas para fins de cálculo.

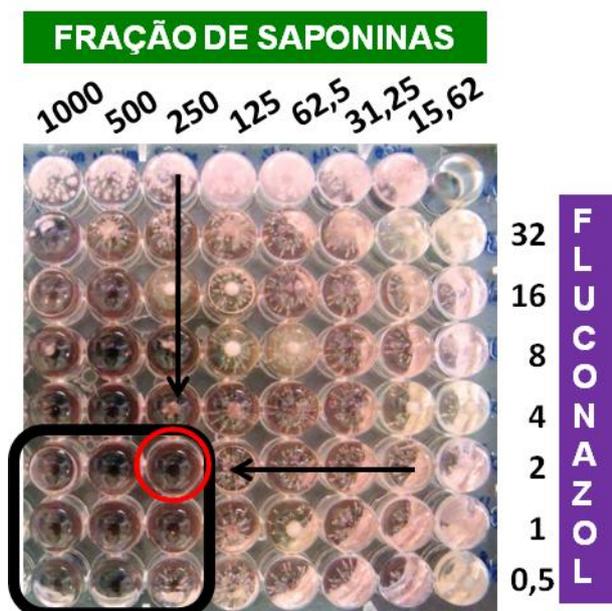
**TABELA 3.** Concentrações da associação de MSF e FCZ promotoras de inibição total do crescimento celular para os isolados de *Candida*, por *checkerboard* e o cálculo do ICIF.

Isolado	Concentração de cada elemento da interação		ICIF
	MSF*	FCZ*	
<i>C. tropicalis</i> CT72A	250	2	0,31
<i>C. albicans</i> CA76A	1000	16	2,00
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	250	8	0,50
<i>C. krusei</i> CK02	250	4	2,25
<i>C. krusei</i> CK05	15,62	1	0,51
<i>C. parapsilosis</i> RL11m	500	8	0,75
<i>C. parapsilosis</i> RL27m	250	4	0,37

\*Valores em µg/mL. MSF: fração purificada de saponinas do fruto de mate e FCZ: fluconazol. ICIF: Índice da concentração inibitória fracionária. Todas as inibições foram fungicidas.

Conforme demonstrado na tabela 3, segundo o ICIF calculado, três isolados ATCC 6258, RL27m e CT72A (Figura 3) sofreram ação sinérgica pela

associação da fração de saponinas com fluconazol. Para o restante dos isolados a resposta mostrou-se indiferente ou de aditividade, como é o caso da *C. parapsilosis* RL11m e da *C. krusei* CK05. Quando não estão associados, os compostos não são capazes de inibir 100% do crescimento deste grupo de leveduras, ao passo que em associação, o efeito sinérgico foi encontrado (tabela 3). Contudo, este não é o primeiro relato de atividade antifúngica a um composto somente quando na presença de fluconazol, incluindo também as espécies resistentes ao FCZ (Da Silva et al., 2013).



**FIGURA 3.** Foto da microplaca no estudo de associação por Checkerboard. Na horizontal as concentrações em  $\mu\text{g/mL}$  de MSF decrescem da esquerda para a direita. Na vertical, as concentrações em  $\mu\text{g/mL}$  de FCZ decrescem de cima para baixo. Na linha superior e na coluna mais a direita da microplaca são testadas as substâncias, MSF e FCZ, respectivamente, isoladamente. A região em destaque pelo retângulo preto corresponde a área de inibição do crescimento fúngico, e o círculo vermelho demonstra o primeiro poço onde a atividade antifúngica é observada.

#### 4.4. Associação entre MSF e FCZ pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Para determinar qual o efeito principal, e se possível em qual concentração da associação, a interação, acima constatada, foi investigada mediante um desenho de poço central (DPC), utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR). O uso de um método espectrofotométrico para determinação do efeito de tratamentos associados é vantajoso porque produz dados quantitativos e permite a utilização de um modelo que se adapta à aplicação da MSR (Te Dorsthorst et al., 2002).

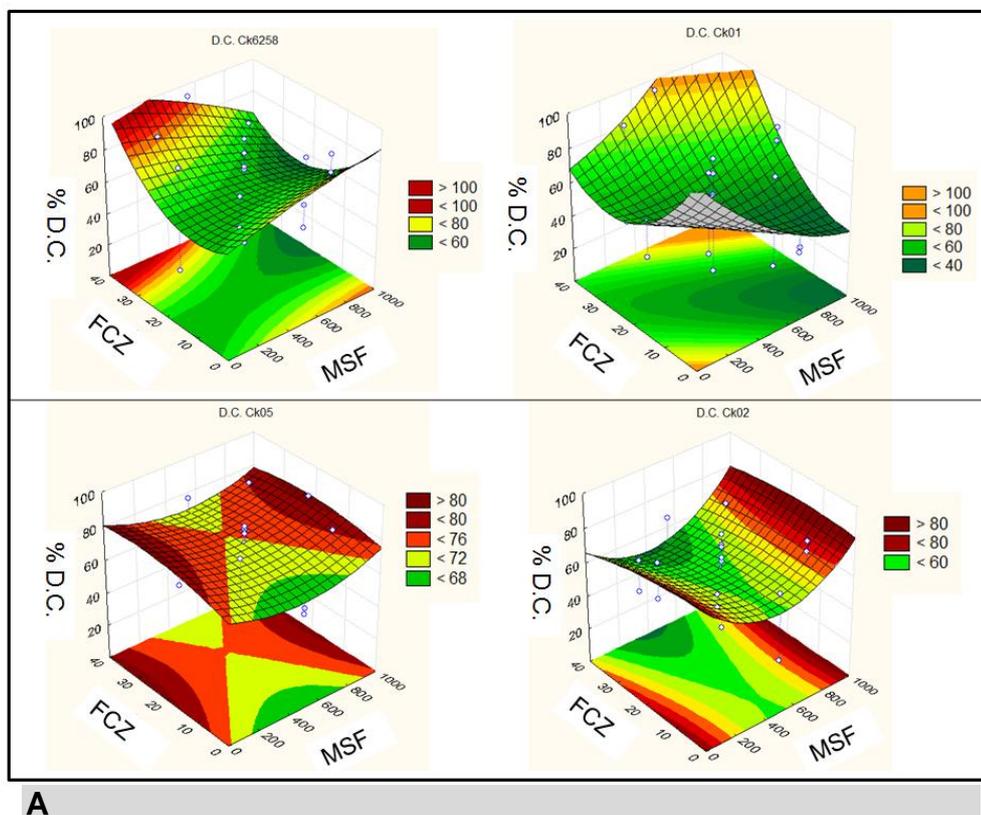
Com base no estudo por *checkerboard*, foram determinadas as concentrações máximas e mínimas para cada elemento da associação, e com o auxílio do software Statistica 8.0 (Tulsa, EUA) foram geradas as demais combinações, incluindo as 5 repetições do poço central (tabela 4).

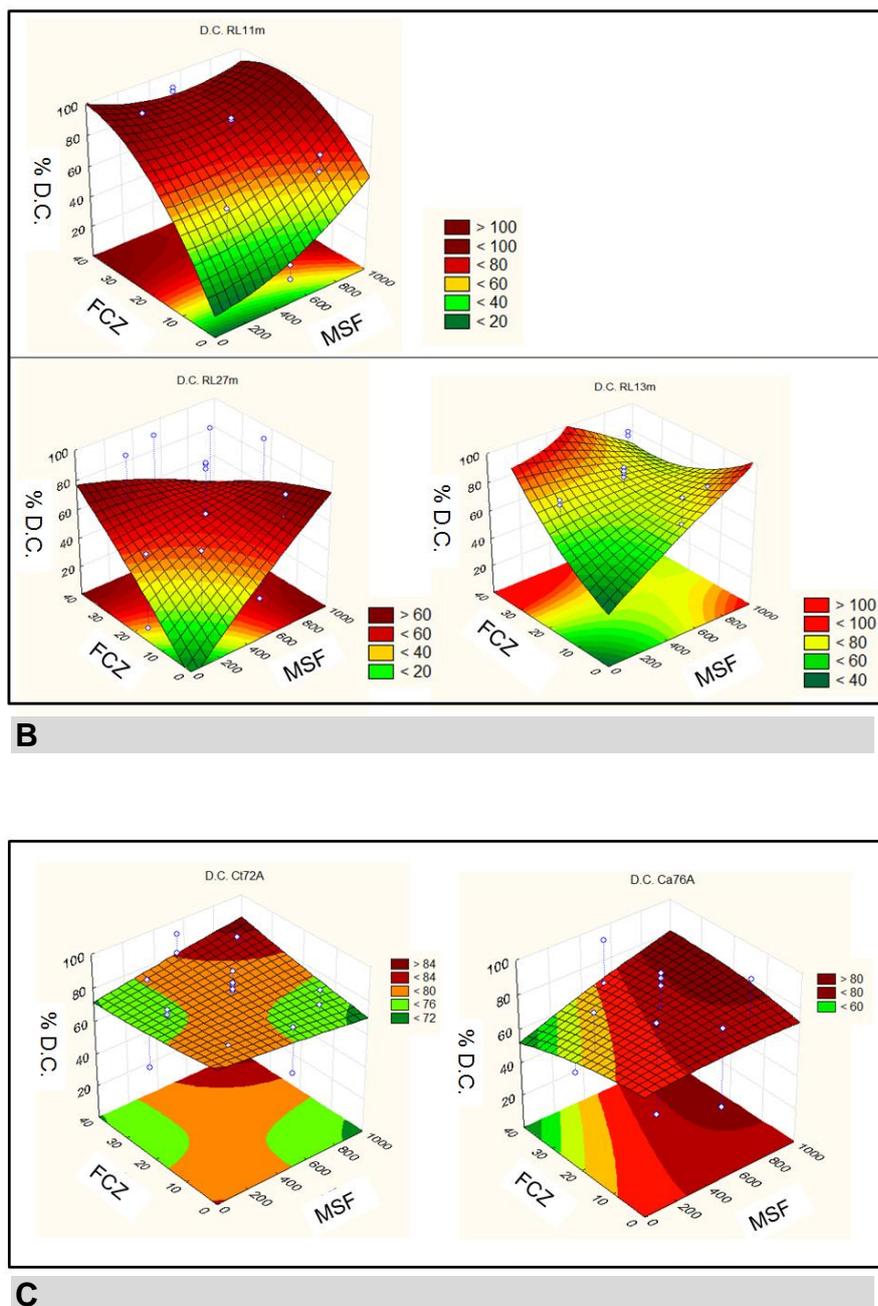
**TABELA 4.** Modelo seguido pelo software para a montagem das combinações aleatórias da fração de saponinas e do fluconazol, no estudo de associação, pelo desenho de poço central.

<b>Nomenclatura</b>	<b>FCZ*</b>	<b>MSF*</b>	<b>Repetições</b>
Máxima	32	800	1
Mínima	6	200	1
Poço Central	19	500	5
Axial Maior	37	925	1
Axial Menor	1	75	1

\*Valores em µg/mL.

A análise gráfica da interação avaliada pela MSR é apresentada na figura 4. O eixo x corresponde à concentração da fração de saponinas (MSF) utilizada, o eixo y a concentração de fluconazol (FCZ), e a área colorida do gráfico é graduada de acordo com a porcentagem de dano celular gerado pelo tratamento. A intensidade da cor vermelha representa maior dano celular, enquanto que a intensidade da cor verde, menor. E a cor amarela representa um dano celular intermediário, conforme as legendas dos gráficos.





**FIGURA 4.** Gráficos de contorno e superfície referentes ao dano celular gerado pelo estudo de associação entre MSF e FCZ, utilizando o DPC, frente às leveduras. Eixo X: [ MSF ]; Eixo Y: [ FCZ ]; Eixo Z ou Área: % de dano celular. Em **A** isolados de *C. krusei*, em **B** isolados de *C. parapsilosis* e em **C** isolados de *C. tropicalis*. e *C. albicans*, respectivamente.

Foram avaliados pelo desenho de poço central (DPC) os efeitos de cada elemento da interação, nas funções linear e quadrática, com nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0,5$ ) e agrupados na tabela 5.

**TABELA 5.** Efeitos estimados (E) na promoção de dano celular e valores de p (p value), para a associação da fração saponosídica (MSF) e o fluconazol (FCZ), quando resultado de uma função linear (L) ou quadrática (Q), no tratamento das leveduras pelo desenho de poço central (DPC).

	<i>C. krusei</i>								<i>C. parapsilosis</i>				<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>			
	ATCC 6258		CK01		CK02		CK05		RL11m*		RL13m		RL27m		CA76A		CT72A	
	E	p	E	p	E	p	E	p	E	p	E	p	E	p	E	p	E	p
<b>MSF (L)</b>	-5,9	0,6	0,7	0,9	4,7	0,6	0,3	1,0	12,4	0,1	4,3	0,8	<b>16,7</b>	0,3	<b>9,0</b>	0,4	1,1	0,9
<b>MSF (Q)</b>	-1,8	0,9	8,2	0,5	<b>15,6</b>	0,1	<b>7,2</b>	0,3	6,9	0,4	-1,9	0,9	-2,4	0,9	-1,2	0,9	-0,5	1,0
<b>FCZ (L)</b>	4,3	0,7	18,5	0,1	-5,0	0,6	4,3	0,5	<b>40,1</b>	<b>0,001</b>	<b>17,4</b>	0,2	<b>14,7</b>	0,3	-2,6	0,8	2,3	0,8
<b>FCZ (Q)</b>	<b>19,9</b>	0,1	22,2	0,1	-2,6	0,8	-4,0	0,5	-16,5	0,1	9,7	0,5	-3,2	0,8	-2,3	0,8	0,8	0,9
<b>MSF + FCZ</b>	-13,0	0,4	<b>27,8</b>	0,1	2,3	0,8	-1,0	0,9	-10,8	0,3	<b>-23,5</b>	0,3	<b>-23,8</b>	0,3	5,4	0,7	<b>5,0</b>	0,6

\*Isolado de *C. tropicalis* com efeito estimado significativo para o FCZ (L), valores em realce.

Valores de p calculados com nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,5$ ).

Em negrito, valores importantes, discutidos no texto.

O grupo dos isolados de *C. krusei*, apresentadas no quadro A da figura 4, não tiveram efeito principal significativo na promoção de dano celular, quer seja de ordem linear ou quadrática, para nenhum dos componentes, isolados e em associação. Ou seja, não foi possível estabelecer uma função modelo para a variável resposta (dano celular), para este grupo de isolados. Entretanto, enquanto o isolado CK01 e a cepa ATCC 6258, resistentes ao fluconazol, apresentaram valores maiores de efeitos para o antifúngico ou para a associação deste com a fração saponosídica, os isolados CK02 e CK05, sensíveis ao fluconazol, apresentaram maiores valores de efeito para a fração de saponinas, apesar de não significativos. Outro estudo de avaliação da atividade de associação antifúngica utilizando a superfície de resposta, e incluindo as leveduras, não avaliou qual componente teve maior efeito, apenas foram feitas correlações de sinergismo com o modelo *checkerboard* (Te Dorsthorst et al., 2002).

Comparado ao estudo do *checkerboard*, o isolado de *C. krusei* CK05, que sofreu ação aditiva pela associação, apresentou pela MSR valores de danos celulares maiores, quando em baixas ou altas concentrações de MSF, enquanto que nas suas concentrações medianas os valores do dano celular decaíram, fato que não foi possível observar no teste qualitativo. Diferentemente do sinergismo encontrado para a cepa padrão ATCC 6258, no estudo da MSR os maiores valores de dano celular ocorrem em direções opostas à associação, ou seja, a inibição do crescimento é favorecida pelas maiores concentrações do antifúngico em conjunto as menores concentrações de MSF, e vice-versa, indicando um possível antagonismo da associação. Em

um estudo que avaliou a associação de antifúngicos para o tratamento *in vitro* da *C. glabrata*, resistente ao fluconazol, também se observou antagonismo, quando associados cetoconazol e flucitosina para cepas resistentes (Alves et al., 2012).

O grupo das *C. parapsilosis*, apresentadas no quadro B da figura 4, é constituído por isolados resistentes ao fluconazol. O primeiro deles, RL11m, exibiu maior efeito do fluconazol na promoção de dano celular ( $p < 0,05$ ), comparado a MSF (Tabela 5 e Figura 4 B). Os outros dois isolados de *C. parapsilosis*, RL13m e RL27m, apesar de apresentarem valores semelhantes para o efeito do tratamento com fluconazol, estes foram ainda menores que os valores da associação da fração de saponinas ao FCZ, cujo efeito foi negativo. Pode, portanto, ter prevalecido o fator negativo da associação, com efeito negativo para a promoção do dano, apesar de nenhum dos valores se mostrarem significativos. Ao contrário, no teste do *checkerboard*, *C. parapsilosis* (RL11m) não sofreu ação sinérgica da interação e *C. parapsilosis* (RL27m) apresentou ICIF sinérgico.

Os isolados da espécie de *C. albicans* e de *C. tropicalis* tiveram, respectivamente, valores maiores de efeito para a fração de saponinas e para a interação MSF e FCZ, porém não significativos. Ambos são resistentes ao FCZ, porém apenas o segundo se mostrou susceptível a ação sinérgica pelo método do *checkerboard*.

Contudo, pela MSR foi possível ainda observar que a associação de MSF com FCZ favorece o dano celular da *C. tropicalis* (CT72A), em altas,

baixas e também medianas concentrações de ambos, apenas desfavorecida pela ausência de um ou de outro (Figura 4 C), em acordo com o sinergismo encontrado por *checkerboard*. Em contrapartida, *C. albicans* (CA76A) parece apresentar um tênue limiar para esta associação, visto que pode ser tanto favorável quanto desfavorável na promoção de dano celular, dependendo da concentração testada (Figura 4 C).

A correlação entre o teste qualitativo (*checkerboard*) e o teste quantitativo (MSR) foi avaliada em dois trabalhos publicados por Te Dorsthorst e colaboradores, em 2002, mostrando uma grande variação, na faixa de 40 a 95% de concordância. A justificativa principal é a natureza dos dados fornecidos por estas duas técnicas. O *checkerboard* se baseia em resultados qualitativos e o MSR em dados quantitativos (Te Dorsthorst et al., 2002; Te Dorsthorst, et al., 2002). Talvez por este motivo, também neste estudo tenha se observado dados em desacordo, apesar de não se estabelecer aqui nenhum cálculo estatístico de correlação para os testes.

#### **4.5. Ensaio de proteção osmótica por sorbitol**

De acordo com o caráter fungicida encontrado na interação dos agentes com atividade antifúngica frente às leveduras, foi avaliada a possibilidade de dano a parede celular fúngica, processo que acarretaria na morte da célula baseada em suas propriedades. A parede celular das leveduras possui quatro principais funções. Primeiro, ela fornece proteção contra choques osmóticos, depois, durante as reduções bruscas na osmolaridade extracelular a regulação se dá pelo influxo de água pela parede. No entanto, a célula fica protegida do inchaço celular, pela constituição firme, mas elástica da sua parede. Ela

também é responsável pela proteção ao estresse mecânico, estabelecendo e mantendo a forma celular, imprescindível para o crescimento e a divisão celular. Por último, a parede celular fúngica também exerce suporte as proteínas de sua superfície, que irão regular a sua permeabilidade (Levin, 2011).

Foi, portanto, avaliada a viabilidade funcional da parede celular através da adição de sorbitol 0,8 M ao tratamento de MSF e FCZ em associação, pela metodologia da microdiluição. Caso houvesse ação antifúngica destes compostos associados sobre a parede celular, o sorbitol presente no meio de cultura impediria a morte celular, agindo como um osmorregulador, tornando visível o desenvolvimento dos isolados no período de sete dias de observação.

Em dois dias de observação, todos os isolados avaliados obtiveram os mesmos valores de CIM na presença e ausência de sorbitol, exceto o isolado CK05 que não cresceu em nenhum dos testes. A partir do terceiro dia, culminando ao sétimo, a CIM dos isolados aumentou, porém da mesma forma para ambos, com ou sem a presença do osmorregulador (Tabela 6). Por sua vez o controle da técnica, utilizando a anidulafungina (AND), antifúngico com alvo sobre a  $\beta$  (1,3)-D-Glucano Sintase, que sintetiza as  $\beta$  glucanas da parede celular fúngica (Pontón, 2008), apresentou dano reversível no período de sete dias na presença do sorbitol e irreversível no mesmo período, na sua ausência, (tabela 7).

**TABELA 6.** Concentração inibitória mínima da associação da fração de saponinas (MSF) e o fluconazol (FCZ), na ausência e presença de 0,8 M de sorbitol (SBT), após 2 e 7 dias de incubação, para oito isolados leveduriformes.

ISOLADO	CIM da Associação MSF - FCZ			
	2 DIAS		7 DIAS	
	S/ SBT MSF - FCZ	C/ SBT MSF - FCZ	S/ SBT MSF - FCZ	C/ SBT MSF - FCZ
ATCC 6258	1000 - 32	1000 - 32	> 1000 - > 32	> 1000 - > 32
CK01	1000 - 32	1000 - 32	> 1000 - > 32	> 1000 - > 32
CK02	75 - 2	75 - 2	1000 - 32	1000 - 32
RL11m	500 - 16	500 - 16	1000 - 32	1000 - 32
RL13m	250 - 8	250 - 8	1000 - 32	1000 - 32
RL27m	250 - 8	250 - 8	> 1000 - > 32	> 1000 - > 32
CT72A	250 - 8	250 - 8	1000 - 32	1000 - 32
CA76A	1000 - 32	1000 - 32	> 1000 - > 32	> 1000 - > 32

Valores de CIM expressos em µg/mL. C/ SBT: Com sorbitol. S/ SBT: Sem sorbitol.  
MSF - FCZ: CIM de MSF e FCZ na associação.

**TABELA 7.** Concentração inibitória mínima da anidulafungina, na ausência e presença de 0,8 M de sorbitol, após 2 e 7 dias de incubação, para oito isolados leveduriformes.

ISOLADO	CIM da Anidulafungina			
	2 DIAS		7 DIAS	
	S/ SBT	C/ SBT	S/ SBT	C/ SBT
ATCC 6258	0,01	0,01	0,01	0,25
CK01	0,03	0,03	0,03	1,00
CK02	0,06	0,06	0,06	> 8,00
RL11m	0,25	0,25	0,06	> 8,00
RL13m	0,12	0,12	0,12	> 8,00
RL27m	0,06	0,06	0,06	0,25
CT72A	0,12	0,12	0,12	> 16,00
CA76A	0,25	0,25	0,25	> 16,00

Valores de CIM expressos em µg/mL. C/ CBT: Com sorbitol. S/ SBT: Sem sorbitol.

A grande particularidade encontrada neste estudo foi a participação de ambos os componentes em concentrações crescentes, que resultou em uma inibição fungistática sobre as leveduras. De modo contrário, no estudo por MSR, diferentes misturas das concentrações dos compostos, em ordem aleatória, resultaram em uma inibição fungicida. Como para alguns isolados já havia se verificado que o aumento demasiado da concentração de MSF reduzia o dano celular, poderia se justificar dessa maneira o crescimento das leveduras nas maiores concentrações da microdiluição.

#### 4.6. Ensaio de Adição do Ergosterol (ERGO)

A capacidade de ligação da associação MSF e FCZ ao ergosterol adicionado foi avaliada mediante um desenho fatorial  $3^{3-1}$ , utilizando quatro níveis de concentração para ergosterol e três níveis para MSF e FCZ (Tab. 8).

**TABELA 8.** Matriz do experimento fatorial para avaliação *in vitro* da interação entre as diferentes concentrações de ergosterol (0 a 250) em conjunto as combinações da saponina de mate (MSF) e fluconazol (FCZ).

ERGO 250		ERGO 150		ERGO 50		S/ ERGO	
FCZ	MSF	FCZ	MSF	FCZ	MSF	FCZ	MSF
1	75	1	75	1	75	1	75
1	500	1	500	1	500	1	500
1	800	1	800	1	800	1	800
6	75	6	75	6	75	6	75
6	500	6	500	6	500	6	500
6	800	6	800	6	800	6	800
19	75	19	75	19	75	19	75
19	500	19	500	19	500	19	500
19	800	19	800	19	800	19	800

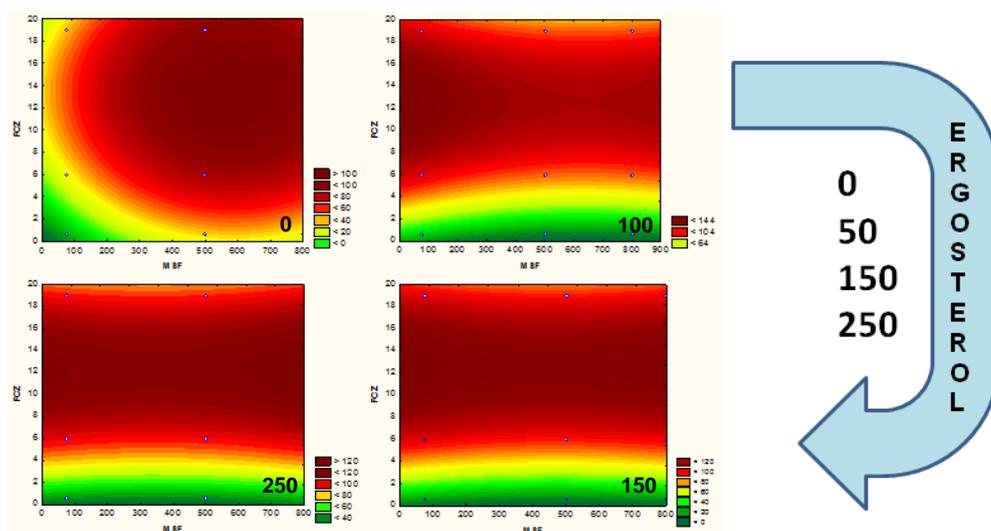
Todos os valores em  $\mu\text{g/mL}$ .

Para fins de controle e comparação, o mesmo teste foi realizado sem adição do ergosterol e utilizando a anfotericina B, cujo mecanismo de ação se dá pela sua ligação ao ergosterol da membrana celular (Gray et al., 2012).

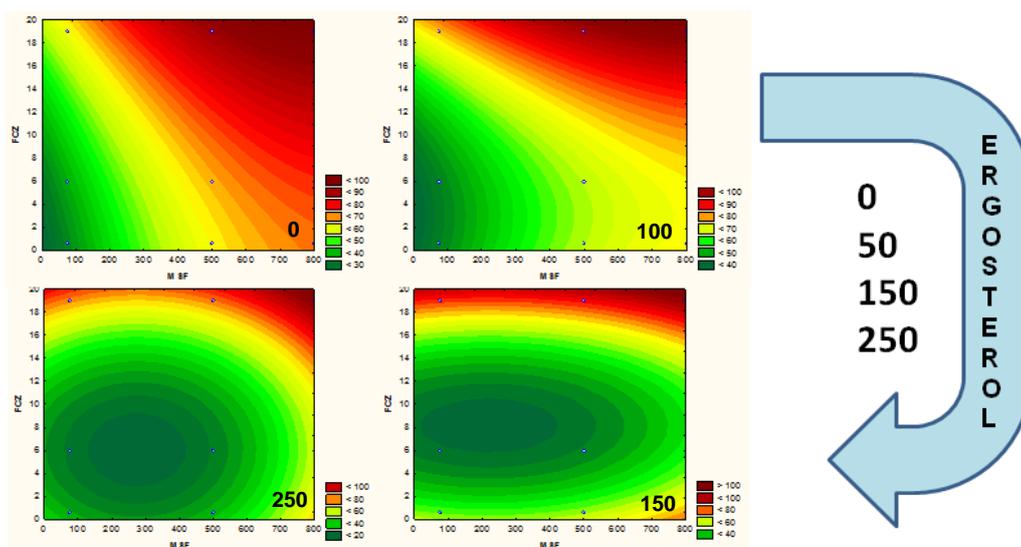
Para *C. tropicalis* (CT72A) (figura 5 A), cepa resistente ao fluconazol, os três tratamentos contendo ergosterol promoveram um dano celular de efeito principal do antifúngico, e não das associações desse com a fração saponosídica ( $p < 0,05$ ). Ao passo que na ausência do esterol, esta diferença não foi realçada. Este fato pode indicar uma possível ação de ligação do ergosterol com a MSF, diminuindo a sua ação no sinergismo e revelando um efeito principal do FCZ. A afinidade por moléculas presentes na membrana celular fúngica foi relatada para outros triterpenos, extraídos de *Ilex integra*, onde se observou a sua capacidade de ligação, principalmente a moléculas apolares presentes na membrana, relacionando esta propriedade a sua atividade antifúngica (Haraguchi et al., 1999). Além disso, um triterpeno glicosídeo obtido da espécie de pepino do mar *Australostichopus mollis*, demonstrou a ligação direta ao esterol de membrana em um estudo *in vitro* (Yibmantasiri et al., 2012)

*Candida parapsilosis* RL27m, isolado também resistente ao fluconazol, apresentou efeito significativo da associação na promoção do dano celular na ausência do ergosterol ( $p < 0,05$ ) (figura 5 B), ao contrário de quando adicionado ao tratamento o ergosterol nas demais concentrações. Este é mais um indício da ocorrência de possível interação entre o esterol exógeno e um dos elementos presentes no tratamento, MSF ou FCZ.

### A) *C. tropicalis* CT72A



### B) *C. parapsilosis* RL27m



**FIGURA 5.** Gráficos de contorno representando a porcentagem de dano celular pelo gradiente de cor (menor dano: verde, intermediário: amarelo e maior dano: vermelho) da área gráfica e conforme legenda, pela utilização das combinações de MSF e FCZ variando as concentrações de ergosterol (0, 50, 150 e 250 µg/mL).

Além disso, variações semelhantes com as encontradas no tratamento da *C. tropicalis* CT72A ocorreram no tratamento de *C. krusei* CK05 (susceptível ao FCZ). As maiores concentrações de ergosterol além de favorecerem a

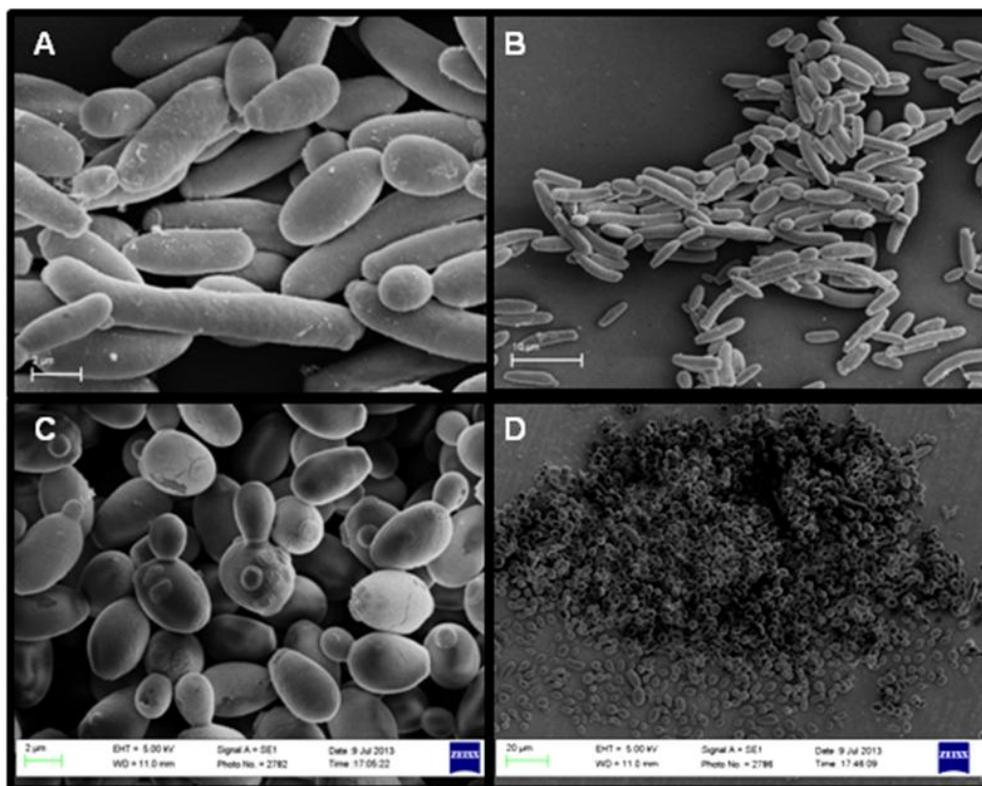
promoção do dano celular para este isolado, sugerem maior efeito do fluconazol presente na interação que MSF, porém esta diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

Nos demais tratamentos, que envolveram os isolados (ATCC 6258, CK02, RL13m e RL11m), não foram observados efeitos principais de promoção de dano celular significativos, para FCZ, MSF, ou a associação nas concentrações de ergosterol testadas ( $p > 0,05$ ).

O controle da técnica com a anfotericina B e a adição de ergosterol aumentou o valor de CIM dos isolados em comparação ao tratamento só com o antifúngico. Dois isolados não puderam ser avaliados pela ausência de crescimento nos testes *in vitro* (CK01 e CA76A).

#### **4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O efeito da associação sinérgica (MSF + FCZ) na morfologia de dois isolados foi examinado pelas imagens obtidas por MEV. A análise das imagens mostrou uma superfície e um formato celular normal para o grupo sem tratamento. Na presença da associação pode-se verificar uma redução no alongamento das células de *C. tropicalis*, além de um grande número de células com pequenos brotos ou cicatrizes (Figura 6).

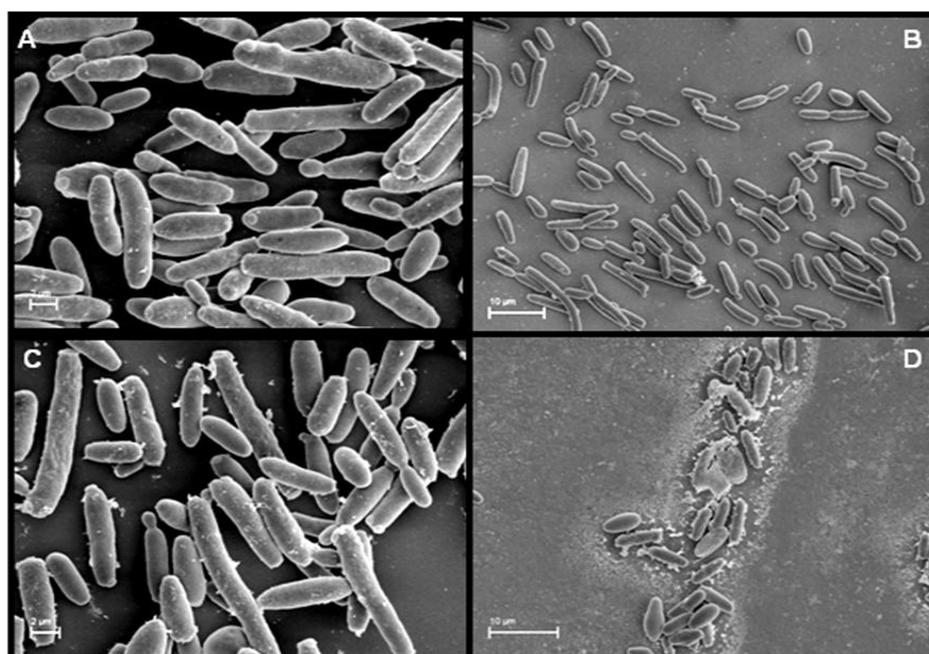


**FIGURA 6.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do isolado de *C. tropicalis* CT72A. A) Controle Celular em maior aumento; B) Controle celular (visão campo); C e D) Sinergismo, dose sub-inibitória (250 µg/mL de MSF + 1 µg/mL de FCZ).

A mistura em dose sub-inibitória não teve efeito aparente sobre a superfície celular de CT72A (Figura 6 C), e também não impediu a proliferação celular (Figura 6 D). Nos quadros C e D se observam as leveduras categoricamente mais inchadas, em contraste as não tratadas (A e B). Além disso, um maior número de células contendo pequenos brotos, ou cicatrizes de brotamento, é encontrado mediante tratamento com as substâncias teste (Figura 6 C). Em outra análise por microscopia eletrônica de varredura, leveduras do gênero *Cryptococcus* expostas a um painel de leveduras “assassinas” (*killer*), demonstraram a ausência de ou pequenos brotos, em um

alto número de células, sugerindo uma ação de interrupção do ciclo celular mediante a presença das toxinas leveduriformes (Fuentefria et al., 2007).

Posteriormente, a avaliação do efeito sinérgico sobre a *C. krusei* foi também realizada. Desta vez foram obtidas às imagens para as dosagens sub-inibitórias dos compostos associados, e ainda isolados, dados apresentados na figura 7.



**FIGURA 7.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da cepa de *C. Krusei* ATCC 6258. A) Dose sub-inibitória de FCZ (16 µg/mL); B) Dose sub-inibitória de MSF (500 µg/mL); C) Controle Celular; D) Sinergismo, (500 µg/mL de MSF + 16 µg/mL de FCZ).

A cepa ATCC de *C. krusei* é sabidamente resistente ao fluconazol. O quadro A representa o tratamento com o antifúngico, enquanto que o quadro C corresponde ao controle celular. Ambos são semelhantes, indicando a ausência de dano à superfície celular pelo tratamento com o fluconazol. Além disso, MSF também não foi responsável por alterações morfológicas, de superfície, quando em contato com as leveduras (Figura 7 B). Entretanto, foi

observada a redução de células por campo, novamente células mais inchadas e agregadas em algum material viscoso. Estas características foram também observadas para leveduras tratadas com os extratos frutíferos de *Punica granatum* (Anibal et al., 2013).

## 5. CONCLUSÕES

A associação da fração de saponinas com o fluconazol frente a leveduras do gênero *Candida*, provoca uma susceptibilidade aumentada em isolados até o momento resistentes. Além disso, para isolados inicialmente sensíveis, com menores doses do antifúngico foi alcançada maior sensibilidade.

Não foi possível afirmar, baseado na Metodologia de Superfície de Resposta qual o fator que mais contribuiu para a interação de forma favorável ou prejudicial à promoção do dano celular, apenas sugeri-las baseadas nos seus valores, exceto pela análise da *C. parapsilosis* RL11m que apresentou efeito majoritário do fluconazol, de forma significativa.

Apesar de não significativos, o maior efeito da fração de saponinas sobre cepas de *C. krusei*, sensíveis ao fluconazol, assim como o pequeno efeito dessa fração em isolados resistentes, pode indicar um favorecimento da ação do antifúngico proporcional ao nível de sensibilidade. Ou seja, uma cepa sensível ao fluconazol apresentaria maior susceptibilidade quando favorecida

a entrada do antifúngico pelas saponinas. Enquanto que em uma cepa resistente a ação das saponinas, se carreadoras do antifúngico, é imprescindível para o alcance da porcentagem de dano celular apresentada neste estudo.

Foi possível refutar a possibilidade de que todas as leveduras inibidas pela associação tivessem igual mecanismo envolvido, devido à variação encontrada nos resultados desta etapa do estudo.

O teste de adição de ergosterol gerou resultados variados para os diferentes isolados expostos ao tratamento com as saponinas de mate combinadas com fluconazol. Entretanto, há evidências consistentes em favor de uma interação entre o esterol exógeno e a fração de saponinas, em parte dos isolados testados.

A causa do dano celular provocado pela associação de FCZ e MSF não foi completamente elucidada através da MEV. Porém as células leveduriformes apresentaram um inchaço decorrido da associação sinérgica das saponinas com o fluconazol, indicando a possibilidade de algum mecanismo envolvido com a membrana plasmática, citoplasma, ou a existência de outro alvo, que não a parede celular.

## 6. PERSPECTIVAS

Avaliar o tipo de interação entre as saponinas e o fluconazol poderá contribuir com a elucidação do mecanismo pelo qual a associação se utiliza para reverter a resistência e aumentar a susceptibilidade das leveduras.

A utilização da técnica do *Time Kill Assay* (ensaio de morte celular), ou outra, que viabilize determinar a cinética da morte celular e visualizar estas leveduras por microscopia, nos diferentes estágios, é também uma alternativa para esta análise.

A pesquisa na área tecnológica, envolvendo a caracterização dos tipos de arranjos micelares presentes nas diferentes concentrações de saponinas e a análise do arranjo formado pelas micelas com o fluconazol esclarece a variação que envolveu a grande flutuação das concentrações testadas neste estudo.

## 7. REFERÊNCIAS

ALANÍS-GARZA, B. A., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G. M., SALAZAR-ARANDA, R., WAKSMAN DE TORRES, N., RIVAS-GALINDO, V. M. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. **J Ethnopharmacol**, v.114, p.468-471, 2007.

ALVES, I. A., BANDEIRA, L. A., MARIO, D. A., 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.

ALVES, R. J. V., JOTZ, G. P., DO AMARAL, V. S., MONTES, T. M. H., MENEZES, H. S., DE ANDRADE, H. H. R. The evaluation of mate (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.695–698, 2008.

ANIBAL, P. C., PEIXOTO, I. T. A., FOGLIO, M. A., HOFLING, J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Braz J Microbiol**, v.44, p. 839-48, 2013.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A., WARNOCK, D. W., MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, 2081-2085, 2000.

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

BALZAN, S., HERNANDES, A., REICHERT, C. L., DONADUZZI, C., PIRES, V. A., JR. GASPAROTTO, A., JR. CARDOZO, E. L. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v.86, p.115-122, 2013.

BARROS, M. B., SCHUBACH, T. P., COLL, J. O., GREMIÃO, I. D., WANKE, B., SCHUBACH, A. [Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic]. **Rev Panam Salud Publica**, v.27, p.455-460, 2010.

BERTÉ, K. A. S., BEUX, M. R., SPADA, P. K. W. D. S., SALVADOR, S., HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **J. Agric. Food Chem**, v.59, p.5523–5527, 2011.

BONDARYK, M., KURZAŃKOWSKI, W., STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Postepy Dermatol Alergol**, v.30, p.293-301, 2013.

BORRÉ, G. L., KAISER, S., PAVEI, C., DA SILVA, F. A., BASSANI, V. L., ORTEGA, G. G. Comparison of methylxanthine, phenolics and saponin contents in leaves, branches and unripe fruits from *illex paraguariensis* A. ST.-HIL (mate). **J Liquid Chromatography Related Technologies**, v.33, p.362–374, 2010.

BRAVO, L., GOYA, L., LECUMBERRI E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v.40, p.393-405, 2007.

BREITBACH, U. B., NIEHUES, M., LOPES, N. P., FARIA, J. E., BRANDÃO, M. G. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **J Ethnopharmacol**, v.147, p.180-189, 2013.

BRION, L. P., UKO, S. E., GOLDMAN, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. **J Infect**, v.54, p.521-529, 2007.

CABRAL, M. E., FIGUEROA, L. I., FARIÑA, J. I. Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. **Rev Iberoam Micol**, v.30, p.31-38, 2013.

CARDOZO JR, E. L., FERRARESE-FILHO, O., CARDOZO FILHO, L., FERRARESE, M. L. L., DONADUZZI, C. M., STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **J Food Composition Analysis**, v.20, p.553–558, 2007.

CARELLI G., MACEDO, S. M. D., VALDUGA, A. T., CORAZZA, M. L., OLIVEIRA, J. V. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Rev Bras PI Med**, v.13, p.110-115, 2011.

CASAROTO, A. R., LARA, V. S. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. **Fitoterapia**, v.81, p.323-328, 2010.

CHOI, Y. H., SERTIC, S., KIM, H. K., WILSON, E. G., MICHPOULOS, F., LEFEBER, A. W. M., ERKELENS, C., KRICUN, S. D. P., VERPOORTE, R. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. **J Agric Food Chem**, v.53, p.1237-1245, 2005.

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., NUCCI, M., PARK, B. J., NOUÉR, S. A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., DA MATTA, D. A., WARNOCK, D., MORGAN, J., BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**, v.44, p.2816-2823, 2006.

CORMICAN, M. G., PFALLER, M. A. Standardization of antifungal susceptibility testing. **J Antimicrob Chemother**, v.38, p.561-578, 1996.

DA SILVA, F. A. Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate). **Dissertação de mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Porto Alegre, 2007.

DA SILVA, C. R., DE ANDRADE NETO, J. B., SIDRIM, J. J., ANGELO, M. R., MAGALHÃES, H. I., CAVALCANTI, B. C., BRILHANTE, R. S., MACEDO, D. S., DE MORAES, M. O., LOBO, M. D., GRANGEIRO, T. B., NOBRE JÚNIOR, H. V. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, p.1691-1700, 2013.

DE BIASE, B., GRAZZIOTIN, N. A., HOFMANN JR, A. E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Rev bras farmacogn**, vol.19, p.582-585, 2009.

DE MEJIA, E. G., SONG, Y.S., RAMIREZ-MARES, M.V., KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **J. Agric. Food Chem**, v.53, p.1966-1973, 2005.

DE RESENDE, P. E., VERZA, S. G., KAISER, S., GOMES, L. F. KUCHARSKI, L. C., ORTEGA G. G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **J Ethnopharmacology**, v.144, p.735–740, 2012.

DORNELAS-RIBEIRO, M., PINHEIRO, E. O., GUERRA, C., BRAGA-SILVA, L. A., CARVALHO, S. M., SANTOS, A. L., ROZENTAL, S., FRACALANZZA, S. E. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, p.31-38, 2012.

ENDO, E. H., CORTEZ, D. A., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Res Microbiol**, v.161, p.534-540, 2010.

ESCALANTE, A., GATTUSO, M., PÉREZ, P., ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J Nat Prod**, v.71, p.1720-1725, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Rev Iberoam Micol**, v.26, p.15-22, 2009.

FARIA, N. C., KIM, J. H., GONÇALVES, L. A., MARTINS, M. E. L., CHAN, K. L., CAMPBELL, B. C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Lett Appl Microbiol**, v.52, p.506-513, 2011.

FENNER, R., SORTINO, M., RATES, S. M., DALL'AGNOL, R., FERRAZ, A., BERNARDI, A. P., ALBRING, D., NÖR, C., VON POSER, G., SCHAPOVAL, E., ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v.12, 236-240, 2005.

FERNANDES, E. S., MACHADO, M. E. O., BECKER, A. M., DE ANDRADE, F., MARASCHIN, M., DA SILVA, E. L. Yerba mate (*Ilex*

*paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: in vitro and in vivo studies. **Nutrition**, v.28, p.1157-1164, 2012.

FILIP, R., LÓPEZ, P., GIBERT, G., COUSSIO, J., FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p.774-778, 2001.

FILIP, R., DAVICINO, R., ANESINI, C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. **Phytother Res**, v.24, p.715-9, 2010.

FRANCIS, G., KEREM, Z., MAKKAR, H. P., BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Br J Nutr**, v.88, p.587-605, 2002.

FRIDKIN, S. K. The changing face of fungal infections in health care settings. **Clin Infect Dis**, v.41, p.1455-1460, 2005.

FROST, D. J., BRANDT, K. D., CUGIER, D., GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **J Antibiot (Tokyo)**, v.48, p.306-310, 1995.

FUENTEFRÍA, A. M., FRANSKOVIÁK, I. M., MERCADO, L. W., RAMOS, J. P., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, P. Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts. **Med Mycol**, v.45, p. 503-12, 2007.

GALIMBERTI, R., TORRE, A. C., BAZTÁN, M. C., RODRIGUEZ-CHIAPPETTA, F. Emerging systemic fungal infections. **Clin Dermatol**, v.30, p.633-650, 2012.

GHANNOUM, M. A., FU, Y., IBRAHIM, A. S., MORTARA, L. A., SHAFIQ, M. C., EDWARDS, J. E., CRIDDLE, R. S. In vitro determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.2459-2465, 1995.

GIOLO, M. P., SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v.46, p. 225-234, 2010.

GONZALEZ, A., FERREIRA, F., VÁZQUEZ, A., MOYNA, P., ALONSO PAZ, E. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **J Ethnopharmacology**, v.39, p.217-220, 1993.

GRAY, K. C., PALACIOS, D. S., DAILEY, I., ENDO, M. M., UNO, B. E., WILCOCK, B. C., BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc Natl Acad Sci**, v.109, p.2234-2239, 2012.

GUPTA, A. K., KATZ, H. I., SHEAR, N. H. Drug interactions with itraconazole, fluconazole, and terbinafine and their management. **J Am Acad Dermatol**, v.41, p.237-249, 1999.

HECK, C. I., MEJIA, C. E. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Science**, v.72, p.138-151, 2007.

HARAGUCHI, H., KATAOKA, S., OKAMOTO, S., HANAFI, M., SHIBATA, K. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. **Phytother Res**, v.13, p.151-156, 1999.

HUANG, S., CAO, Y. Y., DAI, B. D., SUN, X. R., ZHU, Z. Y., CAO, Y. B., WANG, Y., GAO, P. H., JIANG, Y. Y. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biol Pharm Bull**, v.31, p.2234-2236, 2008.

IWAZAKI, R. S., ENDO, E. H., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., GARCIA, L. B., FILHO, B. P. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.97, p.201-205, 2010.

JIN, J., GUO, N., ZHANG, J., DING, Y., TANG, X., LIANG, J., LI, L., DENG, X., YU, L. The synergy of honokiol and fluconazole against clinical isolates of azole-resistant *Candida albicans*. **Lett Appl Microbiol**, v.51, p.351-357, 2010.

JOHNSON, M. D., MACDOUGALL, C., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PERFECT, J. R., REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, P.693-715, 2004.

KANZ Y-R., LEE, H-Y., KIM, J-H., MOON, D-I., SEO, M-Y., PARK, S-H., CHOI, K-H., KIM, C-R., KIM, S-H., OH, J-H., CHO, S-W., KIM, S-Y., KIM, M-G., CHAE, S-W., KIM, O., OH, H-G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Lab Anim Res**, v.28, p.23-29, 2012.

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. **Bioorg Med Chem**, v.20, p.5678-5698, 2012.

KHAN, M. S., AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.90, p.1083-1094, 2011.

KONTOYIANNIS, D. P., MARR, K. A., PARK, B. J., ALEXANDER, B. D., ANAISSIE, E. J., WALSH, T. J., ITO, J., ANDES, D. R., BADDLEY, J. W., BROWN, J. M., BRUMBLE, L. M., FREIFELD, A. G., HADLEY, S., HERWALDT, L. A., KAUFFMAN, C. A., KNAPP, K., LYON, G. M., MORRISON, V. A., PAPANICOLAOU, G., PATTERSON, T. F., PERL, T. M., SCHUSTER, M. G., WALKER, R., WANNEMUEHLER, K. A., WINGARD, J. R., CHILLER T. M., PAPPAS, P. G. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clin Infect Dis**, v.50, p.1091-1100, 2010.

KRCMERY, V., BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect**, v.50, p.243-260, 2002.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v.189, p.1145-1175, 2011.

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. **J Antimicrob Chemother**, v.49, p.345-351, 2002.

LIMA, L. A., JOHANN, S., CISALPINO, P. S., PIMENTA, L. P., BOAVENTURA, M. A. In vitro antifungal activity of fatty acid methyl esters of the seeds of *Annona cornifolia* A.St.-Hil. (Annonaceae) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, p.777-780, 2011.

LIN, M. Y., CARMELI, Y., ZUMSTEG, J., FLORES, E. L., TOLENTINO, J., SREERAMOJU, P., WEBER, S. G. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.4555-4560, 2005.

LOW, C. Y., ROTSTEIN, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. **F1000 Med Rep**, v.3, p.14, 2011.

LÓPEZ, S. N., FURLAN, R. L., ZACCHINO, S. A. Detection of antifungal compounds in *Polygonum ferrugineum* Wedd. extracts by bioassay-

guided fractionation. Some evidences of their mode of action. **J Ethnopharmacol**, v.138, p.633-636, 2011.

LÜCKEMEYER, D. D., MÜLLER, V. D., MORITZ, M. I., STOCO, P. H., SCHENKEL, E. P., BARARDI, C. R., REGINATTO, F. H., SIMÕES, C. M. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytother Res**, v.26, p.535-540, 2012.

MARCOS-ARIAS, C., ERASO, E., MADARIAGA, L., QUINDÓS, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complement Altern Med**, v.11, p.119, 2011.

MOSIMANN, A. L., WILHELM-FILHO, D., DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, **BioFactors**, v.26, p.59–70, 2006.

NAVARRO GARCÍA, V. M., GONZALEZ, A., FUENTES, M., AVILES, M., RIOS, M. Y., ZEPEDA, G., ROJAS, M. G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v.87, p.85-88, 2003.

NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F., TOBÓN, A. M., RESTREPO, A., COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis**, v.51, p.561-570, 2010.

NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F., ALVARADO-MATUTE, T., TIRABOSCHI, I. N., CORTES, J., ZURITA, J., GUZMAN-BLANCO, M., SANTOLAYA, M. E., THOMPSON, L., SIFUENTES-OSORNIO, J., ECHEVARRIA, J. I., COLOMBO, A. L., LATIN AMERICAN INVASIVE MYCOSIS NETWORK. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v.8, e59373, 2013.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother**, v.52, n.1, 1, 2003.

ORTEGA, M., MARCO, F., SORIANO, A., ALMELA, M., MARTÍNEZ, J. A., LÓPEZ, J., PITART, C., MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **J Hosp Infect**, v.77, p.157-161, 2011.

PAPPAS, P. G., ALEXANDER, B. D., ANDES, D. R., HADLEY, S., KAUFFMAN, C. A., FREIFELD, A., ANAISSIE, E. J., BRUMBLE, L. M., HERWALDT, L., ITO, J., KONTOYIANNIS, D. P., LYON, G. M., MARR, K. A., MORRISON, V. A., PARK, B. J., PATTERSON, T. F., PERL, T. M., OSTER, R. A., SCHUSTER, M. G., WALKER, R., WALSH, T. J., WANNEMUEHLER, K. A., CHILLER, T. M. Invasive fungal infections

among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Clin Infect Dis**, v.50, p.1101-1111, 2010.

PAVEI, C., GUZZATTO, P., PETROVICK, P. R., GOSMANN, G., ORTEGA, G. G., Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. **J Liquid Chromatography Related Technologies**, v.30, p.87–95, 2007.

PEIXOTO, M. P. G., TRETER, J., DE RESENDE, P. E., DA SILVEIRA, N. P., ORTEGA, G. G., LAWRENCE, M. J., DREISS, C. A. Worm like micellar aggregates of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (mate): A characterization by cryo-TEM, rheology, light scattering and small-angle neutrons scattering. **J Pharm Sciences**, v.100, p.536–546, 2010.

PERALTA, I. N., COGOI, L., FILIP, R., ANESINI, C. Prevention of hydrogen peroxide-induced red blood cells lysis by *Ilex paraguariensis* aqueous extract: participation of phenolic and xanthine compounds. **Phytother Res**, v.27, p.192-198, 2013.

PEREIRA, D. F., KAPPEL, V. D., CAZAROLLI, L. H., BOLIGON, A. A., ATHAYDE, M. L., GUESSER, S. M., DA SILVA, E. L., SILVA, F. R. M. B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v.19, p.868–877, 2012.

PERES, N. T., MARANHÃO, F. C., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol**, v.85, p.657-667, 2010.

PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v.20, p.133-163, 2007.

PIRES, V. S., GUILLAUME, D., GOSMANN, G., SCHENKEL, E. P. Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-maté (*Ilex paraguariensis*) adulterating plant. **J Agric Food Chem**, v.45, p.1027-1031, 1997.

PONTÓN, J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. **Rev Iberoam Micol**, v.25, p.78-82, 2008.

REX, J. H., PAPPAS, P. G., KARCHMER, A. W., SOBEL, J., EDWARDS, J. E., HADLEY, S., BRASS, C., VAZQUEZ, J. A., CHAPMAN, S. W., HOROWITZ, H. W., ZERVOS, M., MCKINSEY, D., LEE, J., BABINCHAK, T., BRADSHAW, R. W., CLEARY, J. D., COHEN, D. M., DANZIGER, L., GOLDMAN, M., GOODMAN, J., HILTON, E., HYSLOP, N. E., KETT, D. H., LUTZ, J., RUBIN, R. H., SCHELD, W. M.,

SCHUSTER, M., SIMMONS, B., STEIN, D. K., WASHBURN, R. G., MAUTNER, L., CHU, T. C., PANZER, H., ROSENSTEIN, R. B., BOOTH, J., NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES MYCOSES STUDY GROUP. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. **Clin Infect Dis**, v.36, p.1221-1228, 2003.

ROCHA, T. D., DE BRUM VIEIRA, P., GNOATTO, S. C., TASCA, T., GOSMANN, G. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. **Parasitol Res**, v.110, p.2551-2556, 2012.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int J Antimicrob Agents**, v.27, p.7-11, 2006.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v.11, p.275-288, 2011.

SANATI, H., RAMOS, C. F., BAYER, A. S., GHANNOUM, M. A. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, p.1345-1348, 1997.

SANGLARD, D., ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis**, v.2, p.73-85, 2002.

SATHIAMOORTHY, B., GUPTA, P., KUMAR, M., CHATURVEDI, A. K., SHUKLA, P. K., MAURYA, R. New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*. **Bioorg Med Chem Lett**, v.17, p.239-242, 2007.

SCHMOURLO, G., MENDONÇA-FILHO, R. R., ALVIANO, C. S., COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J Ethnopharmacol**, v.96, p.563-568, 2005.

SCHUBERT, A., ZANIN, F. F., PEREIRA, D. F., ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. ST. - HIL. (ERVA-MATE) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Quim Nova**, v.29, p.1233-1236, 2006.

SCHULTZ, A. Introdução a botânica sistemática. **Editora da UFRGS**, 5 Ed Ver, 1985.

SHORR, A. F., LAZARUS, D. R., SHERNER, J. H., JACKSON, W. L., MORREL, M., FRASER, V. J., KOLLEF, M. H. Do clinical features allow

for accurate prediction of fungal pathogenesis in bloodstream infections? Potential implications of the increasing prevalence of non-*albicans* candidemia. **Crit Care Med**, v.35, p.1077-1083, 2007.

SIAU, H., KERRIDGE, D. 5-Fluorocytosine antagonizes the action of sterol biosynthesis inhibitors in *Candida glabrata*. **J Antimicrob Chemother**, v.43, p.767-775, 1999.

SILVA, F., FERREIRA, S., DUARTE, A., MENDONÇA, D. I., DOMINGUES, F. C. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v.19, p.42-47, 2011.

SOMENZI, C. C., RIBEIRO, T. S., DE MENEZES, A. Características particulares da micologia clínica e o diagnóstico laboratorial de micoses superficiais. **NewsLab**, v.77, p.106-118, 2006.

SPARG, S. G., LIGHT, M. E., STADEN, J. V. Biological activity and distribution of plant saponins. Review. **J Ethnopharmacology**, v.94, p.219–243, 2004.

STRASSMANN, B. B., VIEIRA A. R., PEDROTTI, E. L., MORAIS, H. N. F., DIAS, P. F., MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **J Agric Food Chem**, v.56, p.8348–8353, 2008.

SUGAR, A. M., HITCHCOCK, C. A., TROKE, P. F., PICARD, M. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.598-601, 1995.

SUGAR, A. M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing? **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1907-1912, 1995.

SVETAZ, L., ZULJAN, F., DERITA, M., PETENATTI, E., TAMAYO, G., CÁCERES, A., CECHINEL FILHO, V., GIMÉNEZ, A., PINZÓN, R., ZACCHINO, S. A., GUPTA, M. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **J Ethnopharmacol**, v.127, p.137-158, 2010.

TAKETA, A. T. C., BREITMAIER, E., SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (mate). **J Brazilian Chem Society**, v.15, p.205–221, 2004.

TAKETA, A. T., GNOATTO, S. C., GOSMANN, G., PIRES, V. S., SCHENKEL, E. P., GUILLAUME, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex*

species and their in vitro antitrypanosomal activity. **J Nat Prod**, v.67, p.1697-1700, 2004.

TE DORSTHORST, D. T., VERWEIJ, P. E., MEIS, J. F., PUNT, N. C., MOUTON, J. W. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.702-707, 2002.

TE DORSTHORST, D. T., VERWEIJ, P. E., MELETIADIS, J., BERGERVOET, M., PUNT, N. C., MEIS, J. F., MOUTON, J. W. In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.2982-2989, 2002.

TRETER, J., PEIXOTO M. P. G., GIORDANI, R. B., HOLZ, C. L., ROEHE, P. M., TASCA, T., ORTEGA, G. G. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Ilex paraguariensis* ("Mate") fruits. **Lat Am J Pharm**, v.29, p.914-918, 2010.

TOBUDIC, S. KRATZER, C., PRESTERI, E. Azole-resistant *Candida* spp. - Emerging pathogens? **Mycoses**, v.55, p.24-32, 2012.

VAGELOS, P. R. Are prescription drug prices high? **Science**, v.252, p.1080-1084, 1991.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v.2012, 713687, 2012.

VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy: the new frontier. **Future Microbiol**, v.2, p.115-139, 2007.

VERZA, S. G. Obtenção e caracterização de frações purificadas de saponinas de *Chenopodium quinoa* e avaliação da formação de complexos do tipo ISCOM - atividades biológicas das frações e dos complexos formados. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2011.**

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.48, p.1-12, 2007.

WENG, A., THAKUR, M., MALLINCKRODT, B. V., BECEREN-BRAUN, F., GILABERT-ORIOU, R., WIESNER, B., EICHHORST, J., BOTTGER,

S. MELZIG, M. F., FUCHS, H. Saponins modulate the intracellular trafficking of proteins toxins. **J Controlled Release**, v.164, p.74-86, 2012.

WOLDEMICHAEL, G. M., WINK, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. **J Agric Food Chem**, v.49, p.2327-2332, 2001.

YIBMANTASIRI, P., LEAHY, D. C., BUSBY, B. P., ANGERMAYR, S. A., SORGO, A. G., BOEGER, K., HEATHCOTT, R., BARBER, J.M., MORAES, G., MATTHEWS, J.H., NORTHCOTE, P.T., ATKINSON, P.H., BELLOWS, D. S. Molecular basis for fungicidal action of neothyonidioside, a triterpene glycoside from the sea cucumber, *Australostichopus mollis*. **Mol Biosyst**, v.8, p.902-912, 2012.

YOU, J., DU, L., KING, J. B., HALL, B. E., CICHEWICZ, R. H. Small-molecule suppressors of *Candida albicans* biofilm formation synergistically enhance the antifungal activity of amphotericin B against clinical *Candida* isolates. **ACS Chem Biol**, v.8, p.840-848, 2013.

ZEIDLER, U., BOUGNOUX, M. E., LUPAN, A., HELYNCK, O., DOYEN, A., GARCIA, Z., SERTOURE, N., CLAVAUD, C., MUNIER-LEHMANN, H., SAVEANU, C., D'ENFERT, C. Synergy of the antibiotic colistin with echinocandin antifungals in *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p.1285-1296, 2013.

ZHANG, J. D., XU, Z., CAO, Y. B., CHEN, H. S., YAN, L., AN, M. M., GAO, P.H., WANG, Y., JIA, X.M., JIANG, Y. Y. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. **J Ethnopharmacol**, v.103, p.76-84, 2006.