

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE FRAÇÕES BIOATIVAS DE *Uncaria
tomentosa* (Willd) DC. E SINERGISMO COM FLUCONAZOL E
TERBINAFINA**

RENATA COUGO MORAES

PORTO ALEGRE, 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE FRAÇÕES BIOATIVAS DE *Uncaria
tomentosa* (Willd) DC. E SINERGISMO COM FLUCONAZOL E
TERBINAFINA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação por
Renata Cougo Moraes para
obtenção do TÍTULO DE
MESTRE em Ciências
farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Fuentesfria

PORTO ALEGRE, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26 de março de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Fernanda Bruxel

Universidade Federal do Pampa

Profa. Dra. Gilsane Lino Von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Gasparin Verza

Universidade Feevale

CIP - Catalogação na Publicação

Cougo Moraes, Renata

ATIVIDADE ANTI-Candida DE FRAÇÕES BIOATIVAS DE *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. E SINERGISMO COM FLUCONAZOL E TERBINAFINA / Renata Cougo Moraes. -- 2014.

130 f.

Orientador: George González Ortega.

Coorientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Uncaria tomentosa*. 2. Polifenóis. 3. Antifúngicos. 4. *Candida* spp.. 5. Checkerboard. I. González Ortega, George, orient. II. Meneghello Fuentefria, Alexandre, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Análises complementares foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) e Central de Microscopia Eletrônica (CME) desta Universidade. Análises colaborativas foram realizadas no Núcleo de Pesquisas em Bioquímica, Toxicologia e Imunologia (NUBIOTOXIM) da UNIPAMPA.

*"Agradeço todas as dificuldades que
enfrentei; não fosse por elas, eu não teria
saído do lugar. As facilidades nos
impedem de caminhar. Mesmo as críticas
nos auxiliam muito".*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Mais do que um trabalho individual, esta dissertação é o resultado da colaboração e contribuição de várias pessoas num processo que foi tudo, menos solitário. Por esta razão quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. George González Ortega, por seu apoio e amizade, além de sua dedicação, ensinamentos, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alexandre Fuentefria, meus sinceros agradecimentos pelo apoio, disponibilidade e pela confiança depositada desde o início.

Às minhas amigas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada que nesse período me apoiaram, sendo companhia tanto nos momentos alegres quanto nos de dúvidas, aconselhando e dando força para continuar a caminhada. Vocês são muito importantes para mim!

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, com quem vivi um ambiente de verdadeira aprendizagem colaborativa. Muito obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração e por todos os ensinamentos ao longo desses anos!

A todos os meus familiares, avós, tios, primos. Pessoas especiais que diretamente me incentivaram. Impossível mencionar a todos, assim como é impossível não lembrar de todos com amor e saudades. Em especial a minha mãe, Eliane Teresinha Castro Cougo, pelo amor, carinho, incentivo e por sempre acreditar na minha capacidade, e ao meu pai, Renato Vianna Moraes (*in memoriam*), pelo exemplo de garra e determinação que carrego sempre comigo.

Ao meu marido, Luiz Henrique Longhi Rossi, por tudo. Pelo carinho das palavras que me levam a nunca desistir, pelo companheirismo, paciência de todas as horas e pela presença incansável com que me apoiou ao longo desses anos.

E a todos os outros que durante este percurso me ajudaram com um voto de confiança, um sorriso ou uma palavra amiga. Muito obrigada!

RESUMO

Infecções fúngicas resistentes mostram uma crescente prevalência nas últimas décadas, levando à procura fármacos mais eficazes, incluindo produtos naturais. *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) possui uma complexa composição de polifenóis, alcaloides e triterpenos, que tem sido pouco explorada nesse contexto. Assim, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação da atividade anti-*Candida* e de mecanismos de ação eventualmente envolvidos. Para essa finalidade seis isolados de *Candida não-albicans* foram selecionados pelo seu histórico de resistência. Amostras de cascas secas foram extraídas com EtOH a 50%, seguido de concentração e armazenagem a 10 °C durante 24 h. A porção solúvel foi separada e fracionada em fase polimérica sólida, originando três frações ricas em polifenóis, alcaloides e triterpenos. A porção insolúvel em água (Water-insoluble Fraction - WIF) foi retomada no mesmo solvente etanólico, repetindo-se o processo anterior. Os testes exploratórios de susceptibilidade antifúngica revelaram atividade moderada para todas as frações solúveis e uma atividade superior para a fração insolúvel. A análise por CLAE e o teste da Vanilina ácida indicaram a predominância de polifenóis de alta massa molecular (70,8%) em WIF. A associação da fração WIF com terbinafina e fluconazol mostrou uma clara atividade sinérgica, com alterações morfológicas evidenciadas por MEV e pelo teste com sorbitol. Testes utilizando verapamil (inibidor da bomba de efluxo) excluíram a participação deste mecanismo. Pelo contrário, os resultados das análises por DSC e FT-IR apontam para um mecanismo externo à célula. O conjunto das observações sugere um mecanismo de ação sobre a parede celular, provavelmente vinculado a interações intermoleculares entre a fração e os antifúngicos testados.

Palavras-chave: *Uncaria tomentosa*, polifenóis, antifúngicos, *Candida* spp., checkerboard.

ABSTRACT

ANTI-*Candida* ACTIVITY OF BIOACTIVE FRACTIONS OF *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. AND SYNERGISM WITH FLUCONAZOLE AND TERBINAFINE

Resistant fungal infections show an increasing prevalence in recent decades, demanding therefore more effective new drugs, including herbal products. *Uncaria tomentosa* (cat's claw) has a complex polyphenols, alkaloids and triterpene composition, which has been little explored in that sense. Thus, the present study aimed at evaluation of the anti-*Candida* activity and related mechanisms of action. For this purpose six isolates of non-*albicans* *Candida* species were selected owing their history of antifungal resistance. Samples of the dried bark were extracted with 50% EtOH, followed by concentration and storage (10 °C for 24 h) steps. The soluble portion was separated and fractionated on a solid polymer phase, yielding three enriched fractions of polyphenols, alkaloids and triterpenes. The water-insoluble portion (WIF) was dissolved again using the same ethanolic solvent, and submitted to the procedure described above. Screening antifungal susceptibility testing revealed just a moderate activity for all soluble fractions, and a superior one respecting the WIF fraction. HPLC analysis and vanillin acid assay of WIF indicated the polyphenol prevalence (70.8 %). The association of fraction WIF with terbinafine and fluconazole showed a clear synergic activity with morphological changing, as observed by MEV and the wall integrity test with sorbitol. Tests using verapamil (inhibitor of efflux pump) excluded the participation of this mechanism in the synergic response. Moreover, the results from both FT-IR and DSC analysis of WIF, alone and combined with terbinafine and fluconazole, suggest a mechanism acting outside the cell membrane. The results all together hint a mechanism of action probably linked to wall cell, probably due to specific intermolecular interactions between the fraction WIF and both antifungals matter of this study.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, polyphenols, antifungals, *Candida* spp., checkerboard.

LISTA DE TABELAS

Table 1.1 – Content of main bioactive compounds in the crude extract and related fractions prepared from cat’s claw bark. 56

Table 1.2 – Antifungal activity of the crude extract EXT and related fractions prepared from cat’s claw bark against non-*albicans Candida* isolates. 58

Table 1.3 – MIC values ($\mu\text{g/mL}$) determined at 2 and 7 day-treatment of *Candida* spp. isolates with anidulafungine (AND) and the water insoluble fraction (WIF), without and with 0.8 M sorbitol..... 60

Table 2.1 – Fractional inhibitory concentration (FIC) and type of interaction obtained by the checkerboard microdilution method for testing a combination of antifungal agents 83

Table 2.2 – Percentage of cell damage caused by terbinafine (TRB) and fluconazole (FLZ) alone and their combinations with the water insoluble fraction from *U. tomentosa* bark (WIF), after the checkerboard microdilution method. .. 85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens de <i>Uncaria tomentosa</i>	20
Figura 2 – Diferentes morfologias de <i>Candida</i> spp.	25
Figura 3 – Estruturas macroscópicas e microscópicas de <i>Candida</i> spp.....	26
Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura de isolados de <i>C. krusei</i>	26
Figura 5 – Representação da parede celular fúngica.	28
Figura 6 – Composição de uma membrana biológica	29
Figura 7 – Representação de bomba de efluxo.....	31
Figura 8 – Representação do mecanismo de resistência de <i>Candida</i> spp. por alteração na biossíntese do ergosterol.....	33
Figura 9 – Representação do mecanismo de resistência de <i>Candida</i> spp. por mutação no gene ERG11	34
Figura 10 – Via de síntese de esteróis de acetato até ergosterol e colesterol. Os sítios de ação dos inibidores da biossíntese de esteróis estão marcados em azul.	35
Figura 11 – Representação de alguns compostos polifenólicos presentes em cascas de <i>Uncaria tomentosa</i>	37
Figure 1.1. HPLC-PDA profile of oxindole alkaloid, quinovic glycoside and polyphenol contents of the alcoholic <i>U. tomentosa</i> crude extract and related fractions.....	57
Figure 1.2 - Cell inviability from the extract and fractions of <i>Uncaria tomentosa</i> in three different concentrations.....	61
Figure 1.3- Scanning electron microscopy photomicrographs of <i>Candida krusei</i> treated with fraction WIF from <i>Uncaria tomentosa</i>	62
Figura 1.4- FTIR-spectra of the pseudo-mycelium of <i>Candida krusei</i> (CK 04) isolate after treatment with the water-insoluble fraction WIF.....	63
Figura 2.1. Scanning electron microscopy microphotographs of <i>Candida krusei</i> (CK04) treated with fraction WIF and terbinafine (TRB) and fluconazole (FLZ).	86

Figura 2.2. Differential Scanning Calorimetry (DSC) curves.....	87
Figura 2.3. FTIR spectrum of WIF fraction A; terbinafine B; association (WIF:TRB 1:4) C; WIF D; fluconazole E; association (WIF:FLU 1:2) F.	88
Figura 2.4. Scanning electron microscopy photomicrographs from the water insoluble fraction (WIF), (TRB) and fluconazole (FLZ).	90
Figura 2.5. FT-IR spectra of the pseudomycelium of the <i>C. krusei</i> isolate (CK 04) after treatment with WIF, terbinafine, and WIF:TRB.	91

LISTA DE ABREVIATURAS

14 DM - enzima 14 α -demetilase

ABC - *ATP-binding Cassete*

AND - *Anidulafungine*

ANOVA - *Analysis of Variance*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina Tri-fosfato

bZip Cap1 - Zíper de Leucina

Cap1 - *Enzima Adenylyl Cyclase-associated Protein 1*

CDR1 e CDR2 - *Candida Drug Resistance*

CFU - *Colony Forming Units*

CIM - *Concentração Inibitória Mínima*

CLAE-PDA - *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjo de Fotodiodos*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CYP P₄₅₀ - *Citocromos que absorvem o comprimento de onda de 450 nm*

DNA - *Ácido desoxirribonucleico*

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

EGCG - *Epigallocatequina Galato*

ERG11 - *Ergosterol Biosynthesis Gene 11*

EUCAST - *European Comiitte on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EXT - *Hydroethanolic Extract from U. tomentosa*

FIC - *Fractional Inhibitory Concentration*

FICI - *Fractionary Inhibitory Concentration Index*

FLZ - *Fluconazole*

FT-IR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

IFN - Y - Interferon gama

MDR1 - *Multi Drug Resistance 1*

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MF - *Major Facilitator*

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MOPS - *3-N-morpholino Propanesulfonic Acid*

Mrr1 - *Multi Drug Resistance Regulator 1*

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

OAPF - *Oxindole Alkaloids Purified Fraction from U. tomentosa*

QAG - *Quinovic Acid Glycosides*

QAPF - *Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from U. tomentosa*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TAC 1 - *Transcriptional Activator of CDR genes*

Th1 - *T Helper cells*

TRB - Terbinafina

WIF - *Water Insoluble Fraction from U. tomentosa*

WSF - *Water Soluble Fraction from U. tomentosa*

YNB - *Yeast Nitrogen Base*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	15
OBJETIVOS	17
REFERENCIAL TEÓRICO	19
Capítulo 1. Avaliação da atividade antifúngica do extrato e frações de <i>Uncaria tomentosa</i> .	
Artigo 1. Antifungal activity of <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) D.C. on resistant non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> isolates.....	47
Capítulo 2. Avaliação de sinergismo da fração insolúvel de polifenóis de <i>Uncaria tomentosa</i> com fluconazol e terbinafina e possíveis mecanismos de ação.	
Artigo 2. <i>In vitro</i> synergism of a Water-Insoluble Fraction of <i>Uncaria tomentosa</i> combined with fluconazole and terbinafine against resistant isolates of non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> species.....	71
DISCUSSÃO GERAL	103
CONCLUSÕES	109
ANEXOS	111
REFERÊNCIAS	119

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado foi redigida na forma de capítulos, em conformidade com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e encontra-se organizada da seguinte forma:

- Introdução e Relevância do Tema;
- Objetivos: geral e específicos;
- Referencial teórico;
- Capítulos 1 e 2: artigos a serem submetidos à publicação;
- Discussão Geral;
- Conclusões;
- Anexos;
- Referências.

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

Leveduras, principalmente espécies de *Candida* spp., são tidas como os principais agentes causadores de micoses oportunistas (SAGHROUNI *et al.*, 2011). Historicamente, *Candida albicans* é a espécie mais frequente envolvida na candidíase, contudo, a participação de espécies não-*albicans* tem aumentado de forma significativa nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da expressão de fatores de virulência e da aquisição da resistência aos antifúngicos de uso clínico tradicional (MÉAN *et al.*, 2008).

Apesar dos potentes agentes antifúngicos disponíveis, a taxa de mortalidade associada à candidíase ainda é alta (ANDES; LEPAK, 2011), sobretudo em pacientes imunossuprimidos e imunodeprimidos, como portadores de HIV, em tratamento quimioterápico, ou que tenham sido submetidos a transplante de órgãos ou procedimentos cirúrgicos de médio a grande porte (ENDO *et al.*, 2010). Por essa razão, existe um interesse crescente na procura de novos fármacos antifúngicos mais seletivos e menos tóxicos, uma vez que o uso indiscriminado de agentes antifúngicos vem acarretando em um acelerado aumento da resistência desses microrganismos (FORTÚN, 2011).

Nas últimas décadas, tem-se evidenciado interesse em tratamentos à base de produtos naturais para a terapia de candidíases (MONDELLO *et al.*, 2006; NOUMI *et al.*, 2010). Para a espécie *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. (*Rubiaceae*) – conhecida como unha-de-gato – ainda que existam relatos de atividades como antiproliferativa (GONZÁLEZ; VALERIO, Jr., 2006), imunoestimulante (LEMAIRE *et al.*, 1999), anti-inflamatória (AGUILAR *et al.*, 2002), antiviral (REIS *et al.*, 2008) e antioxidante (PILARSKI *et al.*, 2006), os dados sobre atividade antifúngica são bastante incipientes. De fato, há apenas um relato no que se evidenciou melhora clínica em pacientes com candidíase oral, após tratamento com gel contendo extrato de *U. tomentosa* (PAIVA *et al.*, 2009). Contrariamente, a espécie tem sido objeto de vários estudos físico-químicos, destacando altos teores em alcaloides oxindólicos pentacíclicos (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1974; LAUS *et al.*, 1997), triterpenos derivados do ácido

quinóvico (AQUINO *et. al.*, 1991; 1997) e polifenóis, como ácidos fenólicos, monômeros de flavonoides e polímeros de elevada massa molecular, como taninos (HEITZMAN *et al.*, 2005).

Embora existam relatos de ação antimicrobiana, a atividade antifúngica de cascas de *U. tomentosa* ainda não foi prospectada de modo aprofundado. Em vista disso, o presente trabalho tem por objetivo estudar a atividade antifúngica e sinérgica de uma fração rica em polifenóis presentes na casca do caule de *U. tomentosa*, assim como o seu efeito sinérgico com fluconazol e terbinafina contra *Candida* spp. procedentes da Micoteca do Laboratório de Micologia da UFRGS.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica de extrato bruto e frações enriquecidas de cascas de *U. tomentosa* frente a espécies emergentes e resistentes de *Candida não-albicans*, avaliando-se o efeito sinérgico com terbinafina e fluconazol.

2.1. Objetivos específicos

- i) Analisar por CLAE-PDA o perfil químico da matéria prima vegetal, constituída pela casca do caule da espécie;
- ii) Obter frações enriquecidas de alcaloides e triterpenos mediante separação em fase sólida polimérica, assim como de polifenóis com diferentes massas moleculares mediante separação;
- iii) Caracterizar e quantificar os principais polifenóis presentes nas frações de *U. tomentosa* mediante métodos por CLAE-PDA, método da vanilina, UV e espectrofotometria por FT-IV.
- iv) Avaliar a cito e genotoxicidade do extrato e das frações de *Uncaria tomentosa* através do ensaio cometa;
- v) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações e do extrato de *U. tomentosa* frente a isolados das espécies *Candida krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;
- vi) Avaliar o efeito sinérgico da fração de polifenóis de *U. tomentosa* com o antifúngico azólico fluconazol e o derivado alilamínico terbinafina, frente às leveduras emergentes acima relacionadas;
- vii) Caracterizar a interação físico-química entre os polifenóis e antifúngicos mediante DSC e FT-IV, bem como o efeito sobre o potencial zeta celular;
- viii) Caracterizar mecanismo de ação mediante teste do sorbitol, teste da bomba de efluxo, microscopia eletrônica de varredura e teste da composição química do pseudomicélio por FT-IV.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Atividade antifúngica e espécies vegetais

Os antifúngicos efetivamente disponíveis no mercado estão restritos a apenas algumas classes químicas (MATHEW; NATH, 2009), das quais algumas apresentam toxicidade ou problemas de resistência (MUKHERJEE *et al.*, 2003). Nesse contexto, o estudo de substâncias vegetais providas de atividade antifúngica vem merecendo maior atenção (DANELUTTE *et al.*, 2003; MALHEIROS *et al.*, 2005; STEIN *et al.*, 2006; AGÜERO *et al.*, 2007; PACCIARONI *et al.*, 2008). Além do seu uso na forma isolada, a combinação de antifúngicos comerciais com espécies vegetais surge como uma estratégia válida para melhorar a atividade antifúngica, aumentar o espectro de ação, melhorar a tolerância, diminuir os efeitos adversos e reduzir fatores indutores da resistência (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2001; ENDO *et al.*, 2010).

3.2. *Uncaria tomentosa*

Uncaria tomentosa (Willdenow ex Roemer & Shultes) D.C., pertencente à família *Rubiaceae*, é uma liana com espinhos lenhosos popularmente conhecida como unha-de-gato ou *cat's claw*. A espécie é caracterizada como uma trepadeira de aproximadamente 40 m de comprimento e 20 m de altura (POLLITO; TOMAZELLO, 2006) (Figura 1). A espécie possui uma distribuição geográfica bastante ampla, distribuída em sua maioria na África e Ásia (HEITZMAN *et al.*, 2005) e pode ser encontrada naturalmente nas florestas tropicais do Sul e América Central (Peru, Colômbia, Equador, Guiana, Venezuela, Trinidad, Suriname, Guatemala, Costa Rica, Panamá, República Dominicana). No Brasil, *U. tomentosa* se distribui nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e, principalmente, no Acre (POLLITO, 2006).

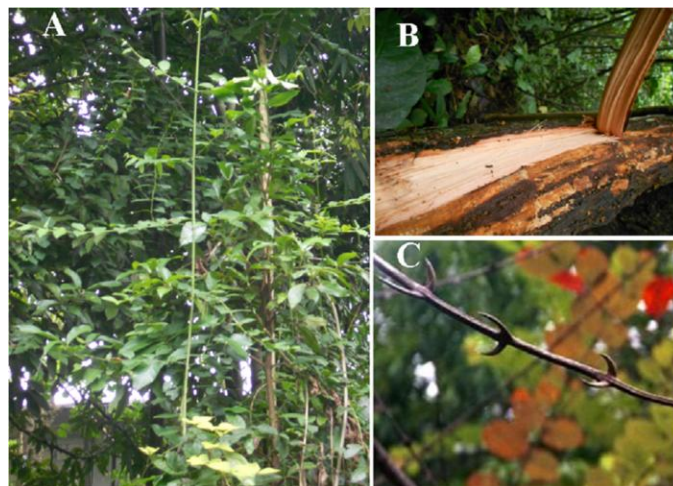


Figura 1 – *Uncaria tomentosa*. (A) Exemplar adulto; (B) mostrando detalhes do caule (C) e dos tomentos. (Imagens gentilmente cedidas por Evelyn Maribel Condori Peñaloza)

A espécie *Uncaria tomentosa* tem sido objeto de diferentes estudos realizados pelo grupo, principalmente tecnológicos, na obtenção de frações enriquecidas de alcaloides, polifenóis e triterpenos derivados do ácido quinóico (PAVEI *et al.*, 2010; PAVEI *et al.*, 2011; PAVEI *et al.*, 2012; KAISER *et al.*, 2013), e de algumas atividades biológicas relevantes associadas a essas, como antiproliferativa (KAISER *et al.*, 2013b; LENZI *et al.*, 2013). Em relação à atividade antifúngica da espécie há poucos relatos (PAIVA *et al.*, 2009) e praticamente nada sobre a potencial associação dos compostos bioativos dessa com antifúngicos convencionais.

3.2.1. Aspectos analíticos e tecnológicos relativos à fração de polifenóis de *U. tomentosa*

A diversidade estrutural e as diferentes massas moleculares dos polifenóis tornam laboriosa a tarefa de desenvolver um método de extração que seja de aplicação geral. Há diversos fatores que podem influenciar nesse processo, como tempo de extração, solubilidade, fração solvente-amostra e tamanho de partícula da matéria-prima. Solventes, como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etila e suas combinações são utilizados na extração de polifenóis, geralmente com diferentes proporções de água (ANTOLOVICH *et al.*, 2000; ROBARDS *et al.*, 2003; ZADERNOWSKI *et al.*, 2005; LUTHRIA *et al.*, 2006). Assim, rotina

e ácido clorogênico foram extraídos eficazmente do trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) por maceração dinâmica com etanol a 30%, a 60 °C, por 2 h (HINNEBURG *et al.*, 2005). Diferentes tempos de extração são utilizados, podendo variar de 1 min (PRICE *et al.*, 1977) a 24 h (BURNS *et al.*, 1971). Extrações mais longas aumentam a chance da oxidação dos polifenóis, a não ser que sejam utilizados agentes redutores. Uma extração com acetona 70% em água, durante 1 min, a 10.000 rpm foi utilizada vantajosamente para extrair os taninos de amostras comerciais de canola (*Brassica napus L.*) (NACZK *et al.*, 1991). No entanto, Deshpande e Cheryan, mostraram que o tempo de extração ótimo para fenólicos em feijão (*Phaseolus vulgaris*) foi de 50 a 60 min. Kaiser (2012) comparou a eficácia da extração de polifenóis de *U. tomentosa* com soluções hidroetanólicas em proporções de 10 a 90%, assim como variações de tempo e proporções fármaco-solvente como variáveis independentes. O máximo de extração foi alcançada na proporção de 50% de solução hidroetanólica, tempo de 2 h e proporção fármaco-solvente 0,5:10 (m/v), evidenciando uma fácil saturação do solvente com o aumento da massa da planta. Concentrações similares foram utilizadas na extração de polifenóis de *Citrus hystrix* (52,9%), *Morinda citrifolia* (40%) e *Castanea sativa* (50%) (CHAN *et al.*, 2009; THOO *et al.*, 2012).

No entanto, uma determinação real do teor de compostos fenólicos esbarra nas dificuldades da análise cromatográfica dos taninos condensados de maior grau de polimerização, presentes nos extratos e frações hidroetanólicas das cascas de *U. tomentosa* (SCHOFIELD *et al.*, 2001; HEITZMANN *et al.*, 2005). Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavonoides, cujos monômeros são unidos por uma ligação carbono-carbono. O método da vanilina costuma ser empregado para quantificação desses compostos, embora o reagente da vanilina detecte tanto flavonoides monoméricos quanto poliméricos. Igualmente, o método é específico para uma classe limitada de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A. Catequinas e proantocianidinas reagem com a vanilina na presença de HCl para produzir um produto de condensação vermelho (AGOSTINI-COSTA, 2003).

Face à escassez de métodos analíticos para a quantificação de polifenóis de baixa massa molecular de *U. tomentosa*, Pavei (2010) desenvolveu e validou metodologia por CLAE para a quantificação de polifenóis em extratos hidroetanólicos das cascas de *U. tomentosa*. Foi observada a presença de cinco picos majoritários, dos quais três foram identificados como ácido clorogênico, ácido caféico e rutina, mediante comparação com padrão de referência.

Diferentemente de alcaloides oxindólicos, há poucos trabalhos tecnológicos de purificação das subfrações dos polifenóis, o que, conseqüentemente impede de estabelecer relações inequívocas sobre a verdadeira fração bioativa.

3.3. Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte do reino *Fungi*; Divisão *Deuteromycotina*; Classe *Deuteromycetes*; Ordem *Cryptococcales*; Gênero *Candida*. É neste grupo dos deuteromicetos que estão incluídos a maioria dos fungos patogênicos ao homem. Mais especificamente, dos fungos considerados patogênicos para humanos, o gênero *Candida* é aquele que ocorre com maior frequência. Dentre as espécies de *Candida* conhecidas, *C. albicans* é aquela que mais prevalece em pessoas imunossuprimidas e imunodeprimidas. Entretanto, nas últimas décadas o número de infecções devido a *C. não-albicans* tem aumentado significativamente (CALDERONE, 2002; RUAN; HSUEH, 2009). Esse aumento pode estar relacionado com o fato de espécies não-*albicans* serem capazes de desenvolver maior resistência a certos antifúngicos (GONZÁLEZ *et al.*, 2008), associado ao melhor poder discriminante dos métodos de diagnóstico, permitindo a diferenciação inequívoca entre as espécies de *Candida* (LIGUORI *et al.*, 2009).

Candida não-albicans são usualmente encontradas em reservatórios humanos e animais, solo, plantas, alimentos e ambiente hospitalar (LACAZ *et al.*, 2002).

3.3.1. Epidemiologia

As espécies de *Candida* são mais frequentemente isoladas da cavidade oral, vulvovaginal e trato urinário e, apesar de serem mais percebidas em pacientes imunocomprometidos, são detectadas em aproximadamente 31 a 55% dos indivíduos sadios (SAMARANAYAKE *et al.*, 2002). Dados epidemiológicos indicam que *C. albicans* é o agente causal mais comum. Contudo, a sua incidência em infecções tem declinado, dando lugar à prevalência de outras espécies, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COLOMBO *et al.*, 2003; BASSETTI *et al.*, 2006), que são as espécies relacionadas no presente trabalho.

Na década de 80, *C. albicans* representava 68% dos isolados de *Candida* detectados em pacientes, enquanto que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* representavam 12, 10 e 3 % dos isolados, respectivamente (KIEHN *et al.*, 1980). Em estudos mais recentes, a maioria dos casos de fungemia tem sido significativamente associada às espécies não-*albicans* (PFALLER *et al.*, 2010). Segundo Colombo (2000), a segunda principal causa de infecção fúngica invasiva deve-se a *C. parapsilosis*, ficando atrás apenas de *C. albicans*. Esta espécie de *Candida* não-*albicans* costuma ser mais frequente em crianças, principalmente entre recém-nascidos prematuros, e está associada a fontes exógenas de infecções, como alimentação parenteral, uso de cateter e de soluções contaminadas (KRCMERY; BARNES, 2002; ALMIRANTE *et al.*, 2006).

Candida tropicalis é uma das espécies de *Candida* não-*albicans* mais prevalente, principalmente na América Latina (PFALLER *et al.*, 2000). No Brasil, acomete de 16 a 26% dos pacientes com candidíase (NUCCI; COLOMBO, 2007). Autores descrevem o isolamento de *C. tropicalis* em hemocultura de pacientes com câncer, leucemia e neutropenia (ALMIRANTE *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI; COLOMBO, 2007). Por sua vez, *Candida glabrata* está envolvida em 5 a 24% dos episódios de candidíase, observando-se sensibilidade reduzida ao fluconazol nos isolados clínicos. Cerca de 10 a 20% das cepas isoladas de hemoculturas foram resistentes ao fluconazol (PFALLER *et al.*, 2000). A taxa de mortalidade associada a esta espécie varia de

10 a 73% (COLOMBO *et al.*, 1999). No caso de *Candida krusei*, a espécie tem uma prevalência minoritária em fungemias, ocorrendo principalmente em pacientes com câncer, transplantados e naqueles infectados por HIV. Contudo, a resistência intrínseca desta levedura ao fluconazol explica sua maior ocorrência nestes grupos específicos de pacientes que, com frequência, recebem esse fármaco profilaticamente (HORN *et al.*, 2009).

3.3.2. Aspectos da estrutura celular de *Candida* spp.

O gênero *Candida* é composto por um grupo heterogêneo de organismos fúngicos. Macroscopicamente, as colônias de *Candida* spp. são de cor creme a amarela. Dependendo da espécie, a textura da colônia pode ser lisa, brilhante ou seca, ou enrugada e maçante. Sob condições habituais, com nutrientes ideais, a levedura cresce na fase log como células de blastoconídios (Figura 2-A), que são células esféricas a ovais com tamanho de aproximadamente 2-5 x 3-7 μm (LARONE, 2002). Além disso, certas espécies, como *C. albicans* e *Candida dubliniensis*, podem produzir um tipo filamentosso de crescimento, como hifas verdadeiras (Figura 2-C3) ou, mais frequentemente, como pseudo-hifas (Figura 2-C1).

A distinção entre as hifas e pseudo-hifas está relacionada com a maneira pela qual elas são formadas. Pseudo-hifas são formadas a partir de células de leveduras ou de hifas por gemulação ou brotamento (Figura 2-B1), mas o novo crescimento permanece ligado à célula-mãe que se alonga, resultando em filamentos com constrições nas junções célula-célula. Não há paredes transversais internas (septos) associados com pseudo-hifas (Figura 2-C2). Em comparação, as verdadeiras hifas são formadas a partir de células de levedura ou mesmo como ramos de hifas existentes. O desenvolvimento das hifas verdadeiras é iniciado por uma projeção do "tubo de germinação" (Figura 2-B2), que se alonga e se ramifica com septos definidos que dividem as hifas fúngicas em unidades separadas (Figura 2-C3) (SILVA *et al.*, 2011).

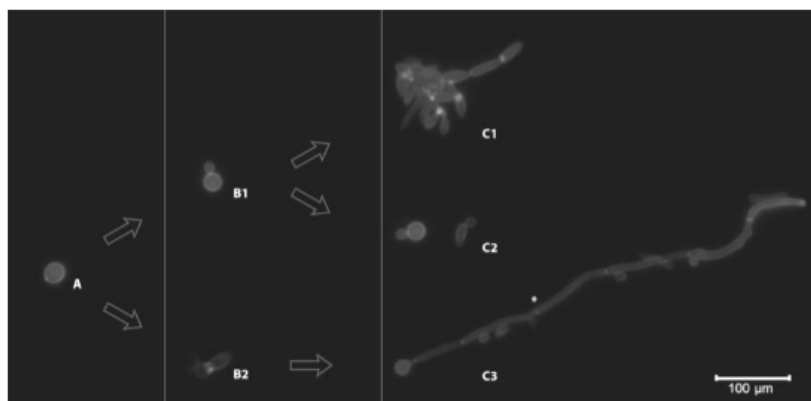


Figura 2 – Diferentes morfologias de *Candida* spp. (A) Blastocóndios; (B1) Forma de reprodução por gemulação ou brotamento; (B2) Formação do tubo germinativo; (C1) Formação de pseudo-hifas; (C2) Forma de levedura; (C3) Formação de hifa (septo interno). (SILVA *et al.*, 2011)

Candida albicans e *C. dubliniensis* são verdadeiramente polimórficas, devido à sua capacidade de formar hifas e/ou pseudohifas, e essas espécies são também referidas como "tubos germinativos positivos", uma característica de diagnóstico (CALDERONE, 2002). Em contraste, *C. glabrata* não é polimórfica, crescendo apenas como blastocóndios (levedura) (Figura 3) (SILVA *et al.*, 2011).

Com relação à *C. parapsilosis*, esta espécie não produz hifas verdadeiras, mas pode gerar pseudo-hifas que são caracteristicamente grandes e curvas, e muitas vezes referidas como "células gigantes" (SILVA *et al.*, 2011).

Em contraste, *C. tropicalis* produz blastósporos ovais, pseudo-hifas e, dependendo de alguns relatos, hifas verdadeiras (Figura 3) (CALDERONE, 2002; LARONE, 2002; YOSHIO; KOUJI, 2006).

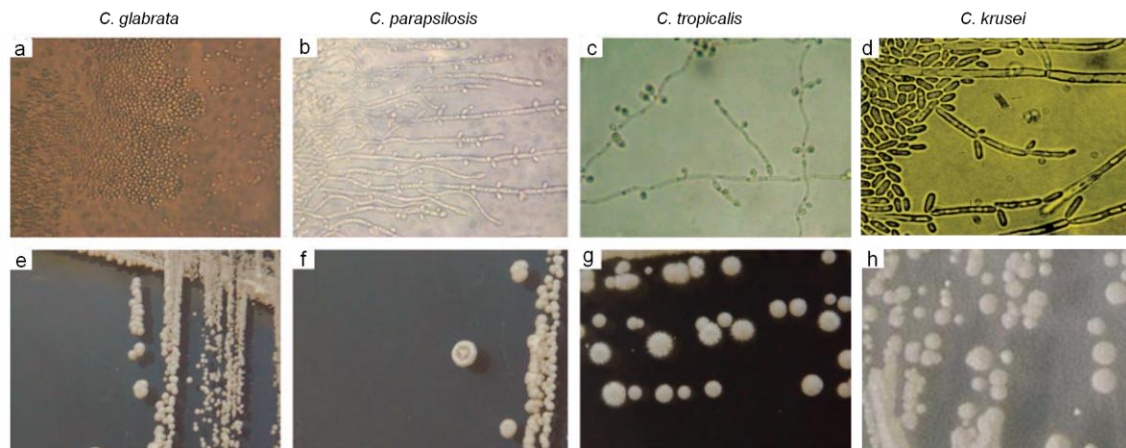


Figura 3 – Estruturas macroscópicas e microscópicas de *Candida spp.* Estruturas microscópicas: (A) *Candida glabrata*; (B) *Candida parapsilosis*; (C) *Candida tropicalis*; (D) *Candida krusei*; Colônias macroscópicas: (E) *C. glabrata*; (F) *C. parapsilosis*; (G) *C. tropicalis*; (H) *C. krusei*. (Adaptado de SILVA *et al.*, 2011).

Candida krusei é normalmente encontrada em duas formas morfológicas básicas, como leveduras e pseudo-hifas. Ambas estão frequentemente presentes simultaneamente nas culturas em crescimento, e não podem ser facilmente separados. Em contraste com a maioria das outras *Candida spp.* que tem forma ovóide, as células de *C. krusei* são geralmente alongadas e têm a aparência de "arroz de grão longo" (Figura 4). Variação na morfologia da colônia de *C. krusei*, também tem sido observada (Figura 4) (YUTHIKA *et al.*, 1994).

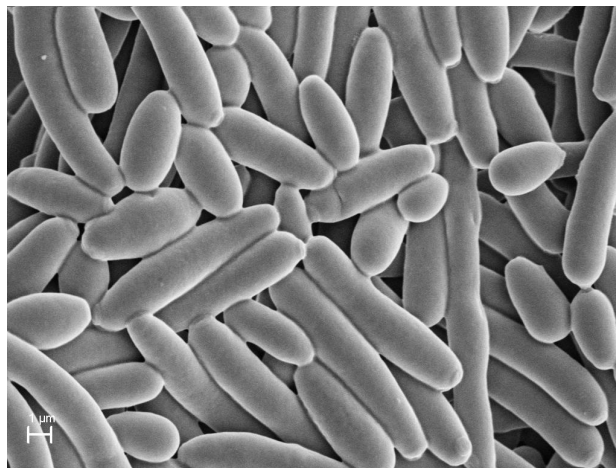


Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *C. krusei*. Diferentes tamanhos de blastóporos e pseudohifas.

Vários dos aspectos a serem abordados na sequência passam a ser melhor entendidos na medida que entendermos os possíveis sítios de ação dos polifenóis e dos fármacos fluconazol e terbinafina, selecionados para o presente estudo.

3.3.3. Parede Celular

A parede celular fúngica é uma estrutura relativamente rígida, porém dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula. Ela determina o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução (RIBAS, 2004; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005; NIMRICHTER *et al.*, 2005; PEREZ), sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos nos ambientes onde são encontrados (DURAN; NOMBELA, 2004). A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais frequentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004). De acordo com Aguilar-Uscanga e François (2003) a parede celular de leveduras apresenta como componentes polímeros de manose (constituindo manoproteínas), glicanas (principalmente beta-glucanas, mas galactanas também podem ser encontradas) e polímeros de N-acetilglucosamina (formando quitina) (Figura 5). Como a parede celular é essencial para a sobrevivência da célula fúngica e está ausente em células de mamíferos, essa se torna um alvo atrativo para a ação de fármacos (FUKUDA *et al.*, 2009).

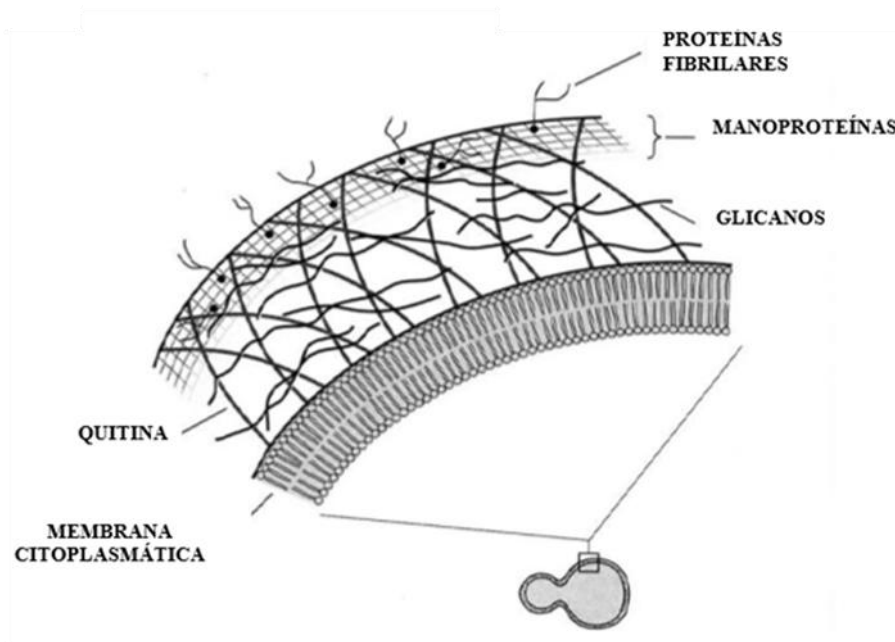


Figura 5 – Representação da parede celular fúngica¹.

Três enzimas têm mostrado serem essenciais para a formação da parede celular fúngica: 1,3-beta-glicano-sintase; 1,6-beta-glicano-sintase e quitina sintase que catalisam a formação de 1,3 e 1,6 beta-glicanos e quitina, respectivamente. Fármacos sintéticos que têm sua ação na parede celular são da classe das equinocandinas. Os representantes dessa classe são a caspofungina, a micafungina e a anidulafungina. Esses atuam inibindo a beta-(1-3)-d-glucana-sintetase, uma enzima da via de síntese da beta-glucanas (FROST *et al.*, 1995). Já foi postulado que extratos de algumas espécies vegetais possam ter atividade sobre a parede (ISHIDA *et al.*, 2006; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2013).

Protetores osmóticos têm sido utilizados para estudar o mecanismo de ação de antifúngicos e antibióticos. Danos aos componentes essenciais da parede celular a partir de agentes antifúngicos (inibidores da síntese da parede celular) causam lise celular na ausência de um protetor osmótico, porém as células continuarão a crescer se um estabilizador adequado estiver presente no meio. Células tratadas com fármacos que interferem na síntese da parede celular frequentemente têm características morfológicas distintas. As mudanças na

¹ fonte: www.abev.com.br/controldeinfeccao/palestras/resistencia.pdf

morfologia podem sugerir possíveis alvos ou modo de ação dos inibidores da parede celular. A morfologia das células tem sido usada como um método para identificar novos antifúngicos inibidores de parede celular (ZACCHINO, 2003).

3.3.4. Membrana Celular

A membrana plasmática de levedura pode ser caracterizada como uma bicamada de aproximadamente 7,5 nm de espessura (VAN DER REST *et al.*, 1995). Um fator que as torna únicas e difíceis de mimetizar é a assimetria entre as duas camadas, no que se refere à distribuição de lipídeos. No caso da membrana plasmática de leveduras, está bem esclarecido que certos componentes lipídicos, como as fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserinas, se localizam preferencialmente no folheto interno ou lado citoplasmático da membrana celular, enquanto outros como as fosfatidilcolinas e esfingolipídeos se encontram majoritariamente no folheto externo ou lado exoplasmático. Em contraste com os eucariotas superiores, em cujas membranas plasmáticas o colesterol é o esterol mais abundante, a membrana plasmática de levedura, além de outros esteróis minoritários, contém majoritariamente ergosterol e uma pequena quantidade de zimosterol, seu precursor (VAN DER REST *et al.*, 1995). Os domínios lipídicos da membrana são constituídos majoritariamente por esfingolipídeos ou por esfingolipídeos e ergosterol, apresentando uma maior espessura bem como uma maior rigidez local (Figura 6).

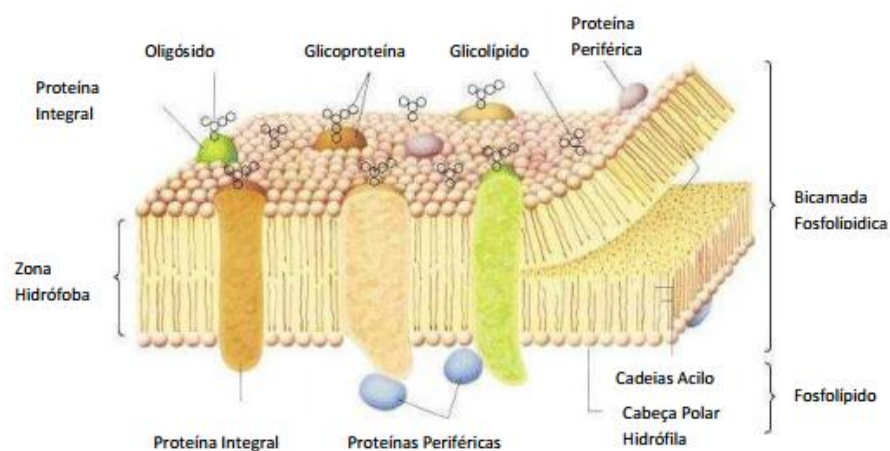


Figura 6 – Composição de uma membrana biológica (adaptado de LODISH *et al.*, 2000).

A membrana celular acaba sendo alvo de muitos fármacos como os poliênicos (anfotericina B, nistatina) que se ligam diretamente ao ergosterol, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, com perda de material citoplasmático, o que pode resultar na morte celular, enquanto que os derivados azólicos e as alilaminas interferem na síntese do ergosterol através da inibição de enzimas, bloqueando etapas precursoras da biossíntese do ergosterol (ASHLEY, 2010)

3.3.5. Bomba de efluxo

Duas famílias de transportadores membranares de efluxo podem ser distinguidas em leveduras, de acordo com a fonte de energia utilizada para a extrusão de substratos (WHITE *et al.*, 2009). As bombas pertencentes à superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) são codificadas pelos genes CDR1 e CDR2 (*Candida Drug Resistance*). Estas contêm dois domínios transmembranares e dois domínios nucleotídicos de ligação, utilizando a hidrólise de ATP para encaminhar os substratos através da membrana. A expressão dos genes CDR1 e CDR2 é regulada pelo fator de transcrição Tac1 (*Transcriptional Activator of CDR genes*).

As bombas pertencentes à superfamília MF (*Major Facilitator*) são transportadores membranares de efluxo codificadas por um único gene MDR1 (*Multi Drug Resistance 1*). A bomba de efluxo codificada pelo gene MDR1 possui 12 domínios transmembranares e utiliza um gradiente eletroquímico de prótons como força motriz para efetuar a extrusão de substratos, estando especificamente envolvida na resistência ao fluconazol. A expressão do gene MDR1 é regulada por pelo menos três fatores de transcrição, entre esses, o mais descrito, o fator de transcrição Mrr1 (*Multidrug Resistance Regulator 1*), o fator de transcrição bZIP Cap1, também envolvido na resposta a estresses oxidativos, e o fator de transcrição Mcm1, envolvido numa grande variedade de processos celulares e co-regulador do fator Cap1 (ALARCO *et al.*, 1999; NOEL *et al.*, 2012). Essas bombas estão envolvidas no transporte de substratos tóxicos para a célula, como antifúngicos, por exemplo, do interior para o ambiente extracelular

(Figura 7). Assim, as proteínas de efluxo contribuem para a manutenção celular dos micro-organismos. Existem substâncias que modulam ou reverterem a resistência a certos antifúngicos por esse mecanismo de ação.

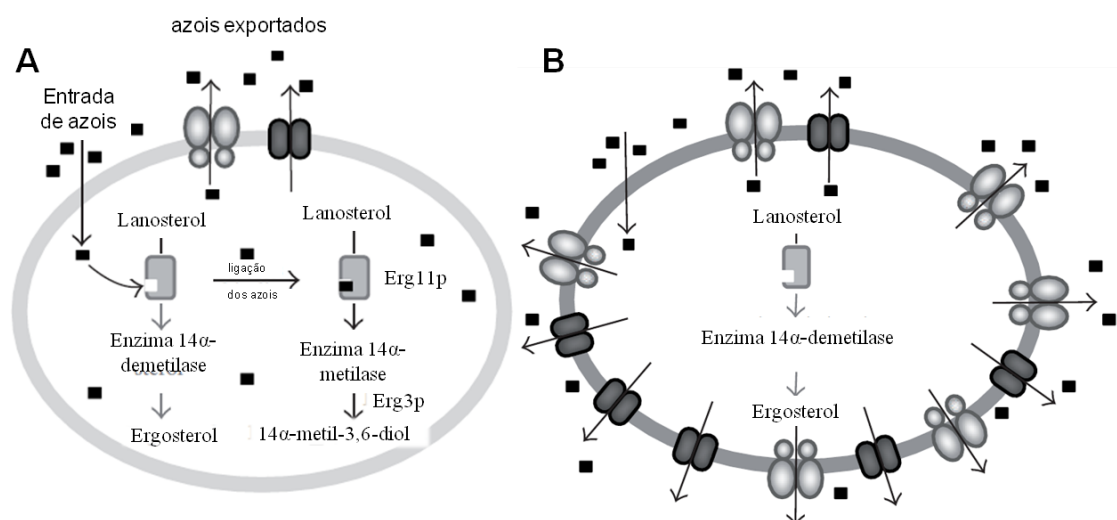


Figura 7 – Representação (A) de uma célula fúngica suscetível aos azóis e (B) mecanismo de resistência de *Candida* spp. por bomba de efluxo (adaptado de VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Sabe-se que fármacos sintéticos como verapamil, omeprazol e ibuprofeno inibem o sistema de efluxo, no entanto requerem concentrações acima do permitido clinicamente (VAN BAMBEKE *et al.*, 2003). Dessa forma, produtos naturais de origem vegetal tem sido testados e identificados como modificadores da resistência por bomba de efluxo (GIBBONS *et al.*, 2004), dentre eles *Rosmarinuns officinallis* (OLUWATUYI *et al.*, 2004) e *Dalea spinosa* (BELOFSKY *et al.*, 2006).

3.3.6. Potencial Zeta

As características físico-químicas da superfície da célula fúngica influenciam a seletividade e a eficácia dos vários antifúngicos. A parede celular dos fungos protege a célula do meio ambiente. Na maioria dos casos, a parede das leveduras apresenta carga negativa (FUCHS *et al.*, 2007). Rodrigues e colaboradores (2012) mediram o potencial zeta de diferentes espécies de *Candida*, obtendo os seguintes valores: *C. albicans*: -9,54; *C. glabrata*: -11,83;

C. krusei: -14,54; *C. parapsilosis*: -11,34; *C. tropicalis*: -14,71. Essa carga negativa se deve, provavelmente, a presença de polissacarídios, devido aos grupos fosfatos. Por outro lado, a presença de átomos de nitrogênio nas proteínas e aminas confere um comportamento mais catiônico à superfície. A predominância de determinados grupos funcionais, na parede da célula fúngica, e a interação entre eles vão conferir carga negativa ou positiva à superfície do micro-organismo (BOTERO *et al.*, 2008). Isso ajuda a compreender e elucidar a possível interação que possa estar ocorrendo entre os agentes antifúngicos.

3.3.7. Mecanismo de ação e de resistência de azólicos e alilaminas

No caso dos antifúngicos azólicos, como fluconazol e itraconazol, o mecanismo de ação está relacionado com o bloqueio da biossíntese do ergosterol mediante inibição da lanosterol desmetilase (enzima oxidativa associada ao citocromo P₄₅₀), bloqueando a conversão de lanosterol em ergosterol, levando à depleção desse esterol da membrana celular fúngica e consequente alteração na permeabilidade da membrana das células fúngicas. Essa inibição da enzima origina-se pela ligação dos nitrogênios não substituídos (N3 ou N4) da sua parte triazólica ao grupo heme férrico e pela ligação do seu N1 substituído à apoproteína do CYP P₄₅₀ (VANDEN BOSSCHE *et al.*, 1989). Além disso, pode produzir um acúmulo de peróxido de hidrogênio, que danifica a estrutura das organelas celulares do fungo.

Atualmente, com a evolução dos fungos e o uso contínuo dos antifúngicos, existem relatos de vários casos de resistências adquiridas (QIAO *et al.*, 2008). Vários mecanismos de resistência têm sido propostos: a) Redução da permeabilidade de *Candida* spp. ao fluconazol devido a alterações nos fosfolipídios e na composição dos esteróis da membrana (Figura 8), reduzindo o influxo de fármaco para o interior da célula leveduriforme. b) Reduzida acumulação intracelular de fármaco em função de superexpressão de transportadores de fármaco por efluxo (KAKEYA *et al.*, 2003). c) Baixa afinidade do CYP₄₅₀ 14DM (alvo dos azóis) para os derivados azólicos (SANGLARD *et al.*, 1995) devido a mutações pontuais no gene ERG11; d)

modificação ou degradação do fármaco no interior da célula (WHITE *et al.*, 1998).

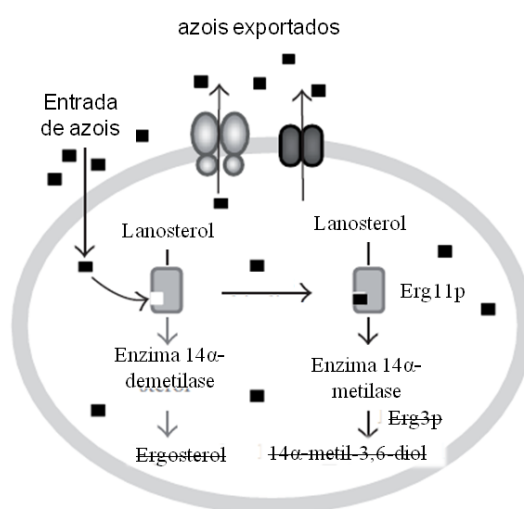


Figura 8 – Representação do mecanismo de resistência de *Candida* spp. por alteração na biossíntese do ergosterol (adaptado de VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Em leveduras do gênero *Candida* o alvo dos agentes azólicos é a proteína Erg11. Esta proteína participa na biossíntese do ergosterol, principal esteroide das membranas das células dos fungos. A Erg11 é uma lanosterol 14 α -desmetilase, que catalisa a demetilação da lanosterol 14 α para formar 4,4'-dimetil colestano-8,14,24-trieno-3-beta-ol. Membro da família do citocromo P₄₅₀, a Erg11p é uma hemoproteína que tem o átomo de ferro como grupo prostético, cuja função é fixar duas moléculas de oxigênio, necessárias para a atividade enzimática (Figura 9). As mutações no gene ERG11 conferem resistência aos azóis pela diminuição da afinidade de ligação do fármaco (CARRILLO-MUNOZ *et al.*, 2006).

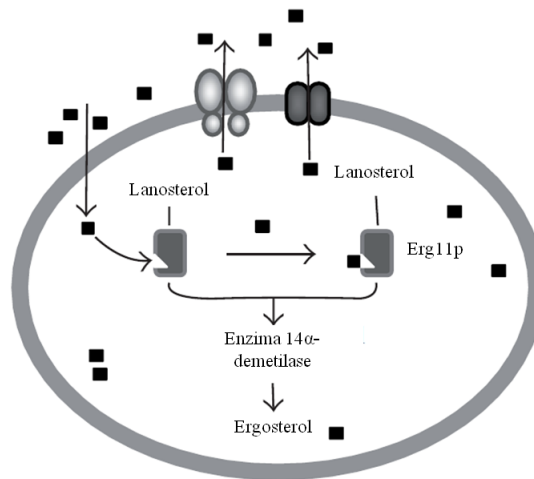


Figura 9 – Representação do mecanismo de resistência de *Candida* spp. por mutação no gene ERG11 (adaptado de Vandeputte *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de resistência antifúngica aos azóis é frequente por duas razões: i) os azóis são fármacos fungistáticos e não fungicidas, podendo deixar grandes populações de células expostas a uma elevada pressão direcional para a resistência; ii) devido aos vários e diferentes mecanismos de resistência inerentes às próprias espécies fúngicas (ANDERSON, 2005).

Por sua vez, terbinafina é um membro do grupo de alilamina de antimicóticos que inibem um passo inicial na biossíntese do ergosterol, a enzima esqualeno-2,3-epoxidase (Figura 10). Com isso ocorre a acumulação maciça de esqualeno e a redução dos níveis celulares de ergosterol (SIDRIM; ROCHA, 2004). Sem ergosterol, a membrana celular é enfraquecida, o que leva a um aumento da permeabilidade celular e um aumento dos níveis tóxicos de esqualeno (KRISTA *et al.*, 2012). Foi demonstrado que pequenas mudanças na expressão da esqualeno epoxidase podem conduzir a uma resistência significativa do crescimento celular à terbinafina, indicando que o aparecimento de isolados resistentes pode ser esperado com a utilização bastante disseminada da terbinafina no tratamento de infecções fúngicas (KLOBUCNIKOVÁ *et al.*, 2003).

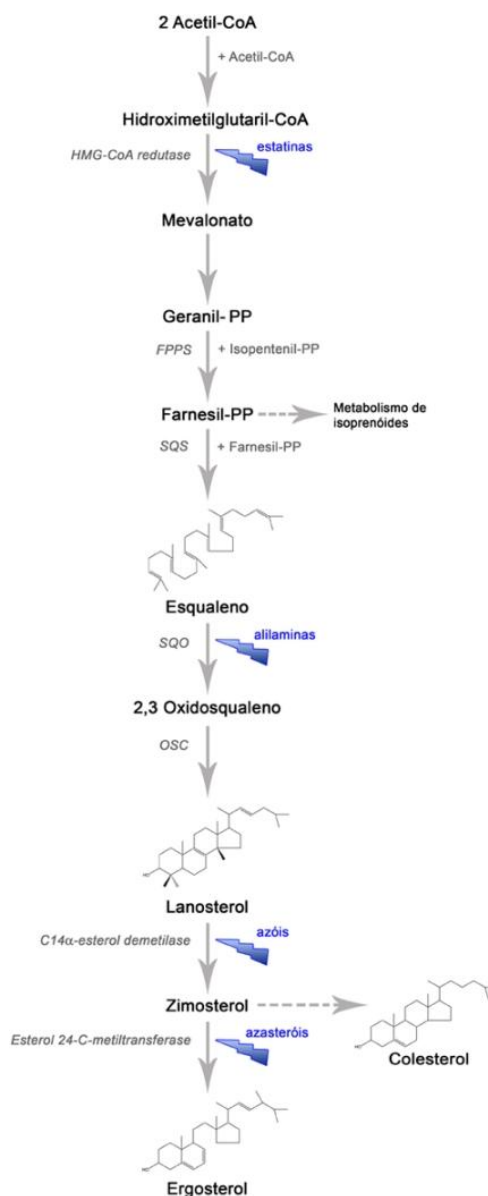


Figura 10 – Via de síntese de esteróis de acetato até ergosterol e colesterol. Os sítios de ação dos inibidores da biossíntese de esteróis estão marcados em azul.²

Klobucniková e colaboradores (2003), estudando possíveis mecanismos de resistência de *Candida* spp. a terbinafina, identificaram uma única mudança de base no gene da enzima esqualeno epoxidase, identificado como a causa de resistência a terbinafina. Além disso, verificaram que mesmo um baixo nível de resistência ao gene pode fazer com que exista uma recuperação dos níveis de

² Fonte: Solange de Castro e Rubem Menna-Barreto disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>

ergosterol. Estes resultados mostram que mesmo pequenas alterações na atividade da enzima fúngica podem conduzir a uma resistência significativa a terbinafina.

3.4. Atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa*

Embora existam relatos de ação antimicrobiana, onde o extrato de *U. tomentosa* foi eficaz na inibição de *E. coli* e *S. aureus*, com valores de CIM que variaram de 0,25 a 1 mg/mL (KLOUCEK *et al.*, 2005), a atividade antifúngica de *U. tomentosa* ainda não foi prospectada de modo aprofundado, existindo apenas um relato no qual se evidencia melhora clínica em pacientes com candidíase oral, após tratamento com gel contendo extrato de *U. tomentosa* (PAIVA *et al.*, 2009).

Paiva e colaboradores (2009) descrevem a atividade clínica de um gel da *U. tomentosa* em 20 pacientes portadores de candidose na cavidade oral, após tratamento de 14 dias, com aplicação local do gel três vezes por dia. O efeito foi superior ao miconazol, utilizado como antifúngico controle. À diferença do grupo-controle, onde 40% dos pacientes apresentaram reações indesejáveis, nenhuma ocorrência similar foi relatada para o grupo tratado com o gel.

3.4.1. Relação entre aspectos fitoquímicos e atividade antifúngica de Unha-de-Gato

A espécie *Uncaria tomentosa* compreende três classes principais de substâncias bioativas: alcaloides, compostos fenólicos e derivados triterpênicos do ácido quinóvico.

3.4.1.1. Polifenóis

A fração polifenólica presente em *U. tomentosa* é composta basicamente por ácidos fenólicos, monômeros de flavonoides e por polímeros de elevada massa molecular, como proantocianidinas e taninos, em sua maioria condensados e derivados, principalmente, da epicatequina e catequina, que podem perfazer até 20% do conteúdo das cascas secas do caule (GONÇALVES *et al.*, 2005;

HEITZMAN *et al.*, 2005). A presença de derivados cafeoilquínicos, como ácido caféico e clorogênico, e de flavonoides, como a rutina foi corroborada mediante análise por CLAE-PDA no extrato hidroetanólico a 40% (v/v) das cascas do caule da espécie (Figura 11) (PAVEI *et al.*, 2010).

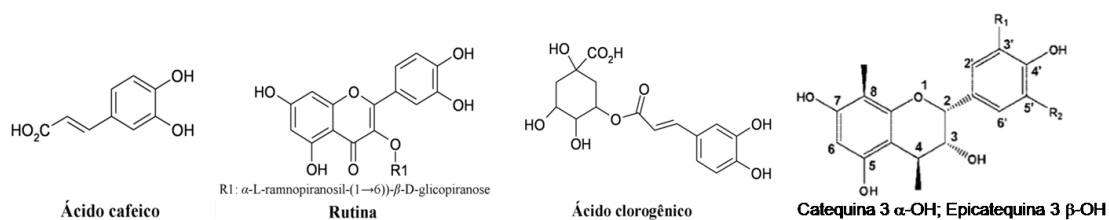


Figura 11 – Representação de alguns compostos polifenólicos presentes em cascas de *Uncaria tomentosa*.

3.4.1.1.1. Atividade antifúngica dos polifenóis

Os relatos sobre a atividade antifúngica associada aos polifenóis de *U. tomentosa* são praticamente inexistentes. Entretanto, polifenóis com presença relatada para outras espécies vegetais tem atividade antifúngica comprovada, especialmente para *Candida* spp.

Assim, polifenóis da classe dos flavan-3-ols do chá verde (*Camellia sinensis*), mais especificamente galatos de epigalocatequina, exibiram atividade dependente do tempo e da concentração contra vários fungos, incluindo *C. albicans* (HIRASAWA *et al.*, 2004). De modo similar, a atividade antifúngica frente a *C. albicans* foi observada para diferentes subfrações de taninos de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), sendo a atividade preponderante atribuída à subfração de proantocianidina triidroxilada no anel B (ISHIDA *et al.*, 2006).

Outros relatos neste mesmo contexto incluem: a atividade para o extrato das sementes de *Vitis vinifera* L. em inibir o crescimento de *C. albicans* (HAN, 2003) e de *Punica granatum* L. contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Em ambos os casos, a atividade está atribuída à presença de polifenóis e taninos, predominantes nos extratos dessas espécies (ENDO *et al.*, 2010).

Entretanto, o mecanismo de ação específico de atividade antifúngica dos taninos frente a espécies de *Candida* não está completamente esclarecido. Alguns autores têm sugerido um vínculo entre a capacidade dos polifenóis interagirem com proteínas e uma ação direta sobre a membrana (HASLAN, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 2003). Outros mecanismos propostos incluem a inibição extracelular de enzimas, privação de substratos necessários para o seu crescimento e, ainda, a inibição direta da fosforilação oxidativa da levedura (SCALBERT, 1991). Atividade anti-*Candida* relatada para *Vitis vinifera* (HAN, 2003) foi associada a um estímulo na produção de interferon- γ (IFN- γ) derivado de células Th1, induzido pela presença abundante de polifenóis, como as procianidinas (NAIR *et al.*, 2002). Estudos feitos em camundongos mostraram que, além dos polifenóis inibirem *C. albicans* (MARODI *et al.*, 1994; DONINI *et al.*, 2007), a atividade é complementada por uma indução imunológica utilizando *Vitis vinifera* (YONGMOON HAN, 2007).

3.4.1.1.2. Interação taninos-proteínas

Algumas aplicações farmacológicas dos taninos foram atribuídas à capacidade de complexação com polissacarídeos, proteínas e íons metálicos (SANTOS; MELLO, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005). Atividades como ação bactericida e fungicida, antiviral, antitumoral tem sido atribuídas, em parte, à capacidade de complexação ou à captação de radicais livres pelos taninos (BRUNETON, 2001; MELLO *et al.*, 2003). Souza-moreira (2013) atribui a atividade antifúngica do extrato de *Plinia cauliflora* aos compostos fenólicos, propondo que o tratamento com uma subfração de polifenóis dessa espécie vegetal tenha desencadeado mudanças na parede celular, observadas por microscopia, onde houve um espessamento da parede. Essas mudanças foram atribuídas ao fato de que taninos formam complexos com proteínas e polissacarídeos da parede celular. Além disso, foi observada redução da porosidade da parede celular.

Sabe-se que a estrutura dos taninos e das proteínas influenciam diretamente os processos de complexação. Por exemplo, proteínas mais abertas e

flexíveis têm maior afinidade pelos taninos, já proteínas mais compactas possuem menor afinidade aos compostos fenólicos (CARVALHO *et al.*, 2004). Além disso, sabe-se que a afinidade das proteínas por taninos é maior naquelas glicosiladas e também quando estão no seu ponto isoelétrico (NAKATSUBO *et al.*, 1997; FICKEL *et al.*, 1999). Quanto aos taninos, moléculas maiores, mas não tão grandes a ponto de não conseguirem se intercalar entre os espaços fibrilares das proteínas, são mais eficazes na formação de complexos (MONTEIRO *et al.*, 2005). Quanto à solubilidade em água do polifenol, existe uma relação inversa, baixas solubilidades favorecem uma complexação mais forte (LUCK *et al.*, 1994).

Existem algumas discussões acerca do por que dessas interações. Luck e colaboradores (1994) já discutiam que a complexação com proteínas se dá por fenômenos de superfície, pelo fato dos polifenóis serem multidentados, diferentes grupos fenólicos se ligam de modo simultâneo a mais de um ponto na superfície da proteína. Jobstl e colaboradores (2004) acreditam que a precipitação ocorre por estágios. Várias moléculas de polifenol, inicialmente, se ligam a um mesmo peptídeo, favorecendo a associação entre duas moléculas de peptídios, levando à formação de grandes complexos precipitados.

Siebert e colaboradores (1996) discutiram a natureza da ligação entre taninos e proteínas, afirmando que esses complexos se mantêm unidos através da combinação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O fato é que Hagerman e colaboradores (1998) tiveram resultados que indicaram que, para polifenóis mais polares, o fator determinante na complexação reside nas ligações de hidrogênio e, para polifenóis não polares, como o galato de epicatequina, as interações hidrofóbicas seriam as dominantes na reação.

3.4.1.2. Derivados triterpênicos

Os derivados triterpênicos predominantes em *U. tomentosa* são heterosídeos derivados do ácido quinóico, ursólico e oleanólico, contendo uma ou duas cadeias de açúcar ligadas ao núcleo triterpênico (AQUINO *et al.*, 1991;

AQUINO *et al.*, 1997). Outros heterosídeos triterpênicos isolados das cascas de *U. tomentosa* são estritamente minoritários, como os derivados do ácido 19 α -hidróxi-ursólico e do ácido piroquinóvico (Kitajima *et al.*, 2003), até então não relatados para outras espécies vegetais.

3.4.1.2.1. Atividade antifúngica de derivados triterpênicos

Para a fração triterpênica de *U. tomentosa* não há relatos de atividade antifúngica. A presença de saponinas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico levantam a possibilidade dessas apresentarem um efeito sinérgico sobre antifúngicos convencionais, como observado para saponinas do mate e fluconazol (KLEIN-SILVA *et al.*, dados não publicados).

A atividade antifúngica de triterpenos de diversas espécies vegetais tem sido amplamente relatada (HOSTETTMAN; MARSTON, 1995; SINDAMBIWE *et al.*, 1998; OSBOURN *et al.*, 2003). Estudos publicados relacionam a estrutura dos triterpenos com sua atividade antifúngica, fato que possibilitaria a identificação do mecanismo de ação. Mshvildadze *et al.* (2000) relatam que triterpenos podem estar envolvidos em mecanismos de ação que implicam em dano na membrana dos fungos, conduzindo a vazamento de material celular e lise celular. Este modo de atuação tem sido também endossado a diversos triterpenos, frente a uma variedade de fungos, incluindo *C. albicans* (LALITHA; VENKATARAMAN, 1991; WOLDEMICHAEL; WINK, 2001). Mais recentemente, Chapagain e colaboradores (2007), testaram a atividade de extratos ricos em triterpenos de algumas espécies vegetais a diferentes fungos. A atividade diferenciada, observada pelos fatores, foi relacionada com as diferenças na composição dos esteróis das células dos fungos, assim como com as diferenças de composição dos triterpenos no extrato. A associação de moléculas de triterpenos com o esterol presente nas células de fungos já foi reportada na literatura (MORISSEY; OSBOURN, 1999).

3.4.1.3. Alcaloides

Os alcaloides de *U. tomentosa* são divididos em dois grupos, os oxindólicos e os seus precursores indólicos, sendo os primeiros os mais representativos da espécie. Por sua vez, os alcaloides oxindólicos são constituídos por derivados oxindólicos tetracíclicos e oxindólicos pentacíclicos. A caracterização da distribuição destes alcaloides isômeros nas diferentes partes do vegetal, assim como o efeito de fatores ambientais tem sido objeto de estudo do grupo (KAISER *et al.*, 2013b; PEÑALOZA *et al.*, 2013). Os tecidos mais ricos em alcaloides são as cascas do caule, seguidos das raízes (STUPPNER *et al.*, 1992; LAUS; KEPLINGER, 1994; LAUS *et al.*, 1997).

3.4.1.3.1. Atividade antifúngica dos alcaloides

Alcaloides de diversas espécies vegetais tem apresentado atividade antifúngica (MENG *et al.*, 2009; KULAKOV *et al.*, 2011; NCUBE *et al.*, 2011). O alcaloide indólico ramiflorina de *Aspidosperma ramiflorum* e o alcaloide oxindólico isatinona de *Isatis costata* apresentaram atividade antifúngica quando testado contra *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans*, respectivamente, atividade inclusive melhor do que quando testado o extrato bruto, concluindo que possivelmente estes alcaloides sejam os responsáveis pela atividade antifúngica exibida (SOUZA *et al.*, 2002; FATIMA *et al.*, 2007). Além disso, berberina, o alcaloide isoquinolínico majoritário de *Fibraurea recisa*, apresentou atividade contra várias espécies de *Candida*, entre elas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (GAO-XIONG RAO *et al.*, 2009)

3.5. Sinergismo

Apesar dos progressos recentes no tratamento de infecções fúngicas invasivas, a incidência de infecções fúngicas está aumentando e as taxas de resposta ao tratamento de primeira linha continuam a ser insuficientes (HERBRETCHT *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2013). Combinações de fármacos podem ser consideradas uma estratégia terapêutica viável, considerando a multiplicidade de alvos de fungos contra os quais os

agentes atuais atuam (MUKHERJEE *et al.*, 2005). Uma vantagem da utilização de fármacos em combinação é o efeito sinérgico, caracterizado quando a atividade antifúngica conjunta é maior do que a adição das contribuições individuais de cada fármaco (ENDO *et al.*, 2010). O sinergismo pode resultar:

(a) da inibição de diferentes fases de uma mesma rota biossintética (por exemplo, a terbinafina e azóis inibem a síntese de ergosterol);

(b) do aumento da penetração intracelular de um agente mediado pela ação de um outro agente sobre a parede celular ou membrana (por exemplo, a anfotericina B e azóis);

(c) da interação de transporte (por exemplo, a inibição do efluxo da flucitosina pela anfotericina B);

(d) da ação em diferentes alvos moleculares (por exemplo, a anfotericina B e equinocandinas).

De forma paralela, o sinergismo leva a uma redução da toxicidade com doses individuais inferiores, ao aumento da taxa de resposta e a uma resposta acelerada à terapia, permitindo tratamentos de menor duração e, como consequência, a redução do tempo de hospitalização e de eventos de resistência adquirida (JOHNSON *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

Atualmente, o método mais utilizado para investigação do sinergismo é o *checkerboard* (método do tabuleiro). Esse método é baseado no protocolo de microdiluição desenvolvido pelo CLSI M27-A3 (*Clinical Laboratory Standard Institute*) para leveduras, no qual são determinadas as CIMs de dois fármacos isoladamente e em associação. Mais especificamente, é avaliada a evolução da CIM individual de cada fármaco na presença de um segundo fármaco e por fim avalia-se se a interação é sinérgica, aditiva, indiferente ou antagonista através do cálculo do FICI (*Fractionary Inhibitory Concentration Index*). No entanto, existe uma dificuldade de interpretação visual, além de não avaliar a real porcentagem de dano celular (SANTOS *et al.*, 2010). Para contornar esse problema de

interpretação dos resultados, uma alternativa é a utilização de um método colorimétrico usando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). O ensaio se baseia na redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis, com formação do produto azul de formazan. O ensaio mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de formazan produzida e ao número de células viáveis em cultura. A principal vantagem do método é permitir a quantificação precisa da proliferação das células fúngicas, podendo detectar pequenas diferenças de atividade. Os resultados costumam ser expressos em percentual de células viáveis ou de dano celular, sendo este último o mais utilizado nos modelos fúngicos (MELETTIADES *et al.*, 2000; CHIOU *et al.*, 2001).

3.5.1. Sinergismo de antifúngicos convencionais com produtos vegetais

Várias investigações têm proposto que os extratos ou frações vegetais podem ser usados em combinação com antifúngicos, a fim de potencializar a sua eficácia, diminuir a dose do antifúngico, e, por conseguinte, reduzir os efeitos adversos (DAGLIA, 2012).

Endo e colaboradores (2010) observaram uma redução de até duas vezes o valor da CIM do fluconazol após combinação com o extrato de cascas de *Punica granatum* (romã), rico em compostos fenólicos. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou padrões de brotamento irregulares e pseudo-hifas. Já a avaliação por microscopia eletrônica de transmitância (MET) evidenciou espessamento da parede celular e alterações no espaço entre a parede celular e a membrana, acompanhado de redução do conteúdo citoplasmático.

3.5.1.1. Fluconazol e o tratamento contra Candidíase

Fluconazol (FLZ) é o antifúngico de uso prevalente no tratamento de candidíases (VANDEN BOSSCHE, 1985; LORTHOLARY; DUPONT, 1997; AMBER *et al.*, 2010). No entanto, nos últimos anos, o uso prolongado de FLZ tem contribuído para o desenvolvimento de resistência em *C. albicans* e outras espécies (SANGLARD *et al.*, 2003; UPPULURI *et al.*, 2008). As melhorias na

eficácia da terapia do fármaco antifúngico podem ser conseguidas através da utilização de terapia de combinação (KHAN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011; AHMAD *et al.*, 2013). Essa combinação tem sido preconizada principalmente entre FLZ e espécies vegetais (AMBER *et al.*, 2010; ENDO *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2012). Khan e colaboradores (2012) relatam a associação sinérgica de eugenol extraído de *Eugenia aromatica* e fluconazol em uma concentração inibitória mínima inicial de 400 e 256 µg/mL, respectivamente, e quando associados passa para FLZ:eugenol 32: 25 µg/mL contra espécies de *C. albicans*. Adicionalmente, eugenol também se mostrou sinérgico com Anfotericina B contra as mesmas espécies resistentes de *C. albicans*, no entanto, sem chegar a propor um mecanismo de ação.

3.5.1.2. Terbinafina e o tratamento contra candidíase

Terbinafina é indicada no tratamento de infecções causadas por dermatófitos. Embora tenha mostrado alta atividade *in vitro* contra uma ampla variedade de *Candida* spp., o seu uso clínico ainda é incipiente (CHEN *et al.*, 2007). De forma similar, a eficácia da terbinafina no tratamento oral da candidíase ungueal, ainda que demonstrada (SEGAL *et al.*, 1996) não teve uso consolidado (MOORE *et al.*, 2001). Há um relato da combinação de caspofungina (CSP) e terbinafina (TRB) *in vitro* contra *C. dubliniensis*, *C. kefyr* e *C. albicans* resultando em interações positivas contra as duas últimas espécies citadas (GIL-LAMAIGNERE, 2004). Neste estudo, o sinergismo só foi observado em cepas resistentes a TRB que se tornaram susceptíveis na presença de CSP. Em contraste, indiferença foi observada contra cepas que já eram sensíveis a TRB, indicando que CSP pode, possivelmente, inibir a resistência da TRB. Já que CSP e TRB afetam a permeabilidade da célula, através da parede celular ou dano na membrana, respectivamente, foi sugerido que, quando combinados, um deles pode aumentar a permeabilidade da célula para o outro fármaco. Além disso, é possível que, cepas com altos valores de CIMs tenham uma menor permeabilidade ao antifúngico e, quando tratado concomitantemente

com CSP, essa associação aumenta a permeabilidade. Desse modo, a concentração intracelular de TRB aumentaria, afetando a síntese da membrana.

Até o momento, não foram encontrados relatos de sinergismo de terbinafina com espécies vegetais para o tratamento de candidíase. Desse modo, essa abordagem se torna interessante como exploração de uma possível terapia alternativa.

3.6. Efeito de fatores metodológicos em testes de susceptibilidade a antifúngicos

Vários fatores podem afetar os resultados desses testes, incluindo a concentração do inóculo, pureza da água, composição e pH do meio de cultura, temperatura, tempo de incubação, propriedades físico-químicas do agente antifúngico e variações na leitura dos resultados (LASS-FLOR *et al.*, 2010). Como resposta, a CLSI e a EUCAST (*European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) desenvolveram protocolos padrão. Entretanto, ambos os protocolos não são exatamente iguais, observando-se diferenças enquanto tempo de incubação, concentração do inóculo e modo de leitura dos resultados, por exemplo (ARENDRUP *et al.*, 2010).

Capítulo 1. Avaliação da atividade antifúngica do extrato e frações de *Uncaria tomentosa*.

A ser submetido ao periódico Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Introdução

A prevalência de infecções causadas por fungos tem registrado aumento expressivo nas últimas décadas (SHAO *et al.*, 2007), associado ao número elevado de pacientes imunossuprimidos e imunodeprimidos (portadores de HIV, em tratamento quimioterápico, submetidos a transplante de órgãos e procedimentos cirúrgicos de médio a grande porte) (YONGMOON HAN, 2007; ENDO *et al.*, 2010). Concomitantemente, o uso indiscriminado de agentes antifúngicos vem acarretando em um acelerado aumento da resistência fúngica, caracterizada por alterações do alvo molecular e diminuição da concentração intracelular do fármaco (SOJAKOVA *et al.*, 2004).

Nesse contexto, existe um interesse crescente na procura de novos fármacos antifúngicos mais seletivos e com menor toxicidade, incluindo produtos naturais para a terapia de candidíases (CORREA *et al.*, 2002; ISHIDA *et al.*, 2006; ENDO *et al.*, 2010). De fato, vários estudos relatam a atividade antifúngica de espécies vegetais, porém poucos abordam questões pertinentes ao mecanismo de ação ou às alterações morfológicas causadas no fungo pela espécie vegetal em questão.

Sobre *Uncaria tomentosa*, especificamente, há pouco publicado em relação a sua possível atividade antifúngica. Entretanto, foi relatada melhora clínica em pacientes com candidíase oral, após tratamento com gel contendo o seu extrato (PAIVA *et al.*, 2009). A identificação da fração ou de compostos bioativos responsáveis por essa atividade permanece desconhecida, até a presente data.

Tendo em vista os fatos apresentados, este capítulo trata da avaliação da atividade anti-*Candida* de *U. tomentosa*, bem como o possível mecanismo de ação envolvido. De forma complementar, tópicos de cito- e genotoxicidade do extrato e frações de *U. tomentosa* foram também abordados.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. on resistant non-*albicans Candida* isolates.

Renata Cougo Moraes^a, Aline Jacobi Dalla Lana^a, Samuel Kaiser^a, Anderson Ramos Carvalho^a, Luis Flávio Souza de Oliveira^b, Alexandre Meneghello Fuentefria^{ac}, George González Ortega^{a*}

^a Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, Santana,
Porto Alegre - RS - Brazil - CEP: 90610-000.

^b Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF),
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Universitário, Uruguaiana -
RS - Brazil - CEP: 96400-100.

^c Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
(PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento
Leite, 500, Porto Alegre - RS - Brazil - CEP: 90050-170.

* Corresponding author: Tel: +55(51)3308 5278, +55(51)3308 5231

Email: ortega@farmacia.ufrgs.br (G.G. Ortega)

Keywords: Cat's claw, polyphenols, antifungal, yeast

SYNOPSIS

Objectives: The aim of this study was to investigate the in vitro antifungal activity of the hydroethanolic extract (EXT) and related fractions of quinovic acid glycosides (QAPF), oxindole alkaloids (OAPF), water-soluble (WSF) and insoluble fractions of polyphenols (WIF) from *U. tomentosa* bark against non-*albicans* *Candida* resistant isolates. Cytotoxicity and genotoxicity of the major fractions were also assayed.

Methods: The growth inhibition was assayed by the broth microdilution method according to the CLSI M27-A3 guideline. The most active fractions were evaluated regarding cell ultrastructure, sorbitol metabolism, and infrared (FT-IR) analysis of pseudomycelia of *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. Fluconazole, terbinafine and anidulafungine were used as reference drugs.

Results: EXT and all fractions were able to inhibit non-*albicans* *C.* growth in concentrations ranging from 500 to 3.9 mg/L. Nonetheless, the WIF showed the best in vitro anti-*Candida* activity (3.9 mg/L–15.62 mg/L). This fraction was composed mainly by high molecular mass polyphenols (70.8%) and, to a lesser extent, oxindole alkaloids (7.9%) and quinovic acid derivatives (7.8%). No significant cytotoxicity and genotoxicity could be noticed. As observed by scanning electron microscopy (SEM), yeasts treated with fraction WIF underwent morphological alterations and loss of integrity of the cell wall.

Conclusions: The *U. tomentosa* water-insoluble fraction (WIF) composed mostly by high molecular mass polyphenols showed significant antifungal activity in several non-*albicans* species, among them isolates resistant to terbinafine, fluconazole and anidulafungin. Noticeable microscopic and physicochemical changes in the cell wall indicated it as the main target related to this activity.

Keywords: *Uncaria tomentosa*; cat's claw, polyphenols, antifungal, *Candida*

Capítulo 2. Avaliação de sinergismo da fração insolúvel de polifenóis de *Uncaria tomentosa* com fluconazol e terbinafina e possíveis mecanismos de ação.

A ser submetido ao periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Introdução

Em virtude dos casos de resistência relatados para o tratamento antifúngico atual, a terapêutica combinada vem ganhando força na tentativa de melhorar o sucesso da resposta terapêutica (CHAMILOS; KONTOYIANNIS, 2006; YU *et al.*, 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Limitações como a elevada toxicidade, a baixa tolerância e o baixo espectro de ação conduziram ao estudo da eficácia da terapêutica combinada (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

A fração insolúvel em água dos polifenóis de cascas de caule de *U. tomentosa*, normalmente descartada dos testes biológicos, mostrou atividade anti-*Candida* em testes preliminares. O presente trabalho teve por objetivo corroborar essa atividade, assim como avaliar o efeito desta fração quando em combinação com os antifúngicos comerciais fluconazol e terbinafina. Fluconazol é o fármaco mais utilizado para tratamento da candidíase, contudo casos de resistência e de toxicidade já têm sido atribuídos (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Terbinafina, embora normalmente utilizada para o tratamento de dermatófitos (SANGLARD *et al.*, 2003), tem sido testada contra candidíases, mostrando resultados promissores (KLOBUCNIKOVÁ *et al.*, 2003).

Tendo em vista os fatos apresentados, o presente capítulo teve por objetivo não apenas estudar a combinação de fármacos para terapia antifúngica, mas também a tentativa de elucidação do que está ocorrendo com os compostos nesse momento, para isso, técnicas como DSC, FT-IV e microscopia eletrônica foram utilizadas. Como complementação, foi avaliada a bomba de efluxo.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Artigo 2. In Vitro Synergism of a Water Insoluble Fraction of *Uncaria tomentosa* combined with fluconazole and terbinafine against Resistant non-*albicans Candida* Isolates

Renata Cougo Moraes^a, Aline Jacobi Dalla Lana^a, Samuel Kaiser^a, Bruna Pippi^b,
Alexandre Meneghello Fuentefria^{ab}, George González Ortega^{a*}

^a Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, Santana, Porto Alegre - RS - Brazil - CEP: 90610-000.

^b Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA), Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre - RS - Brazil - CEP: 90050-170.

* Corresponding author: Tel: +55(51)3308 5415, +55(51)3308 5231

Postal address: Av. Ipiranga, 2752, sala 607, Santana, Porto Alegre - RS - Brazil

CEP: 90610-000

Email: ortega@farmacia.ufrgs.br (G.G. Ortega)

ABSTRACT

The combination of antifungal drugs as well as with non antifungal drugs is seen today as an established therapeutic approach against fungal resistance; it includes natural products as well (9). Hence, in this work, the potential synergy between an insoluble fraction (WIF) from *Uncaria tomentosa* bark, and the antifungals terbinafine (TRB) and fluconazole (FLZ) against six non-*albicans* *Candida* resistant strains was investigated. A checkerboard inhibitory assay demonstrated synergy in 66% of the cases for WIF-TRB combination and 50% for WIF-FLZ one. The best synergistic cell damage was demonstrated unequivocally for the associations of WIF and TRB (1.95:4.0 µg/mL) and WIF and FLZ (1.95:8.0 µg/mL) with about 80% of cell damage. Comparatively, for the fluconazole resistant isolate *C. krusei* CK04, these compounds alone caused cell damage inferior to 50%, at the same concentrations. DSC and infrared analysis demonstrated intermolecular interactions between WIF and either TRB or FLZ. Hence, quite likely the synergistic effect is related to interaction events occurring outside the cell wall between antifungal and cat's claw polyphenols. A direct action on the cell wall is suggested, without connection with the ABC efflux pump mechanism.

4. DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação foi desenvolvida tendo como hipótese de trabalho a atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa*. Com o intuito de verificar a validade dessa hipótese e a qual fração da unha-de-gato pode ser atribuída a atividade, fez-se a determinação da concentração inibitória mínima da fração purificada de alcaloides, fração purificada de derivados de ácidos quinóvicos, fração solúvel e fração insolúvel em água de polifenóis. Comparativamente, avaliou-se o extrato hidroetanólico. Para essas frações especificamente de *U. tomentosa* não foram encontrados estudos na literatura que identifiquem a qual é atribuída tal atividade. A partir disso, observou-se que, embora todas as frações possuam determinada atividade antifúngica, valores relevantes foram atribuídos a fração de polifenóis insolúvel em água. Essa fração normalmente aparece sendo descartada na maioria dos estudos biológicos e fitoquímicos sobre unha-de-gato, o que explicaria a falta na literatura de relatos sobre sua composição e outros estudos afins.

Dessa forma, a etapa inicial do trabalho destinou-se à caracterização da fração insolúvel em água, obtida por maceração das cascas de unha-de-gato com solução hidroetanólica a 50%, seguida de filtração, concentração a vácuo, armazenamento a 10 °C por 24 h e posterior filtração para separar a parte solúvel. O precipitado formado foi armazenado a 37 °C em estufa. Inicialmente a fração foi analisada por CLAE-PDA, onde se observou semelhança no perfil cromatográfico de alcaloides e derivados do ácido quinóvicos entre todas as frações, porém diferindo no conteúdo em g%. Já no conteúdo de polifenóis observou-se diferença marcante tanto no perfil cromatográfico quanto na porcentagem. A principal distinção da fração WIF está no fato de ter um maior conteúdo de polifenóis de alta massa molecular, quando em comparação com WSF, fato este que também pôde ser observado através do método da vanilina. Através de dados do ultravioleta (dados suplementares - anexo 1), não foram observados picos correspondentes a flavonoides na fração de polifenóis de alta massa molecular. E, através do infravermelho observou-se picos característicos

de polifenóis, como a catequina e seus polímeros. O RMN (dados suplementares, anexo 2) também corrobora com a hipótese da fração WIF ser composta majoritariamente por derivados de catequina e epicatequina, uma vez que o C^{13} mostra um espectro típico de proantocianidinas. De acordo com Dey and Harborne (1989), a ressonância devido ao anel C de catequinas ocorre na região δ 25–85, e a do anel A e B na região δ 96–180. Esse achado corrobora com o observado por Navarrete (2011) em que o extrato composto majoritariamente por proantocianidinas de *Pinus maritimus* apresenta espectro de RMN semelhante ao encontrado para a fração insolúvel em água de *U. tomentosa*. Certamente, a elucidação da composição em polifenóis dessa fração exigirá uma pesquisa fitoquímica mais aprofundada.

De forma complementar, analisou-se a citotoxicidade e genotoxicidade da fração insolúvel, uma vez que, como já comentado, essa fração era normalmente descartada, e comparou-se com o extrato e a fração solúvel. A fração WIF, assim como as demais, não apresentou evidências de citotoxicidade nem de genotoxicidade, corroborando com os estudos de Santa Maria (1997) para o extrato da mesma espécie.

Muitos casos de resistência ao fluconazol já foram relatados (FERREIRA *et al.*, 2005; QIAO *et al.*, 2008), tornando pertinente a investigação de alternativas. Nesse sentido, foi avaliada sua interação junto à fração WIF (anexo 3). Assim, isolados de *C. krusei* e *C. glabrata*, intrinsecamente resistentes ao FLZ (CANUTO *et al.*, 2002) e que se mostraram resistentes frente a uma concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol, passaram a ser susceptíveis a uma concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ após associação desse com WIF. Uma das potenciais vantagens dessa associação seria a redução de efeitos colaterais e adversos relatados para o fluconazol (CATALÁN; MONTEJO, 2006; SHEPPARD; LAMPIRIS, 2008).

Comparativamente, terbinafina, que normalmente é utilizada para o tratamento de fungos filamentosos, foi testada para atividade anti-*Candida* em combinação com a fração WIF. Embora o valor de *breakpoint* da TRB não seja

considerado pela CLSI, a resistência a uma concentração maior que 4 µg/mL caracteriza dermatófitos resistentes a TRB (MUKHERJEE *et al.*, 2003). Destaca-se a combinação WIF:TRB para as cepas CK01, CG40039 e RL03 nas quais foi possível observar reversão da resistência de 32 µg/mL de TRB, para até 4 µg/mL. Destaca-se a importância deste achado, por ser o primeiro relato de combinação de TRB com uma espécie vegetal para o tratamento de *Candida* sp.

A possibilidade de mecanismos celulares terem participação nos resultados observados foi investigada pelos ensaios do sorbitol e da bomba de efluxo.

O ensaio do sorbitol refere à função deste polioliol como protetor osmótico da parede celular. Em sua presença, caso o mecanismo de ação seja na parede celular, as células fúngicas continuam a crescer. No presente estudo foi observado que a presença de sorbitol diminuiu a atividade antifúngica da fração WIF (de 3,91-15,65 µg/mL passaram a 31,25 - 125 µg/mL), mostrando que a resistência envolve efeitos ocorridos em nível de parede celular e, possivelmente esse seja seu mecanismo de ação. Esse resultado corrobora com o de Souza-Moreira (2013) que constatou possível mecanismo de ação de taninos de *Plinia cauliflora* (CIM= 156 µg/mL) na parede celular de *C. albicans* após testes do sorbitol, com confirmação através da alteração da arquitetura da parede fúngica visualizada através de microscopia eletrônica de transmissão. Ainda no citado estudo, foi sugerido que essa fração rica em taninos formasse um complexo taninos-parede celular, uma vez que o composto em questão tem capacidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos.

Aditivamente, fez-se o teste com verapamil, inibidor da bomba de efluxo, e percebeu-se que tanto o fluconazol quanto a terbinafina testados frente a cepas resistentes de *C. não-albicans* não melhoraram sua atividade, indicando que provavelmente, no sinergismo, a fração WIF não atue inibindo a bomba de efluxo. No entanto, o teste do verapamil é específico para um tipo de bomba, a bomba ABC (que codifica o gene CDR) e, apesar de haver vários relatos de resistência azólica relacionadas a essa bomba (SANGLARD *et al.*, 1995;

SANGLARD *et al.*, 1997; PINJON *et al.*, 2005), sabe-se que existem outros tipos de bombas e outros genes envolvidos, já relatados inclusive na resistência de *C. glabrata* (SANGUINETTI *et al.*, 2005) e também em *C. krusei* (KATIYAR *et al.*, 2001), portanto esse mecanismo de efluxo não pode ser descartado antes de serem realizados mais testes confirmatórios. Adicionalmente, corroborando com Pinto e Silva (2009), esses autores não verificaram relação entre os isolados de *C. parapsilosis* com resistência ao FLZ e às bombas de efluxo do tipo ABC. Segundo eles, a resistência dessa espécie pode ser devido a mutações nos genes que codificam as enzimas da biossíntese do ergosterol, ocasionando uma sensibilidade diminuída ao alvo.

Além disso, foi analisado o efeito do tratamento na composição química da membrana do pseudomicélio mediante FT-IR. Nesse teste, observou-se que, tanto o controle sem tratamento quanto o fungo resistente tratado com terbinafina, não apresentaram alterações. Por outro lado, o fungo tratado com a fração WIF e o tratado com a associação WIF:TRB mostraram claras alterações nas regiões que correspondem a proteínas e polissacarídeos, principais componentes da parede celular. Acredita-se que esse tenha sido o primeiro estudo no que diz respeito a alteração química de *Candida* spp. em compostos com atividade sinérgica. Paralelamente, Galindo e colaboradores (2013) analisaram o efeito de nanopartículas de ouro na composição química de fungos do gênero *Phanerochaete chrysosporium*. Nesse estudo, pela observação de pequenas variações (diminuição da intensidade das bandas) nas regiões correspondentes a lipídios, proteínas e polissacarídeos do FT-IR, quando comparados ao padrão sem tratamento, ele sugere que o fungo não está mais produzindo novas hifas e que está ocorrendo lise das células devido a diminuição desses componentes tão essenciais para a sobrevivência do fungo. Embora os resultados da associação WIF:FLZ (FT-IR) não terem demonstrado diferença significativa eles estão apresentados como dados suplementares (anexo 4).

No que diz respeito à microscopia eletrônica de varredura realizada nos fungos com e sem tratamento, observou-se que o controle sem tratamento e as

cepas resistentes ao fluconazol e a terbinafina sob tratamento com esses antifúngicos não apresentaram ou apresentaram poucas alterações morfológicas. Já nas cepas tratadas com a fração WIF e também com WIF:TRB e WIF:FLZ observam-se claras mudanças morfológicas, como padrões irregulares de brotamento, material depositado sobre a parede celular e perda da integridade celular. Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura, em que as drogas antifúngicas e extratos de plantas podem afetar a morfologia e ultra-estrutura de leveduras (NAKAMURA *et al*, 2004; ISHIDA *et al*, 2006; ENDO *et al*, 2010).

Para aprimorar a avaliação dos resultados apresentados foram verificadas alterações dos compostos separadamente e combinados por meio de técnicas de DSC, FT-IR e MEV.

No DSC, evidenciou-se deslocamento e desaparecimento de diferentes processos endotérmicos, principal característica de pureza, formação de complexos e formação de novo produto. Diferentemente de ArunPrasad (2010), que no seu estudo não observou diferenças físico-químicas na associação de TRB e o polímero PEG 6000 através de técnicas como DSC e FT-IV, no presente trabalho as diferenças observadas na associação sugerem uma mudança em suas estruturas, indicando que existe uma interação ocorrendo entre os dois compostos precursores e, provavelmente, não é apenas a soma de efeitos. De modo geral, os dados obtidos da análise por DSC estão em consonância com as alterações observadas no FT-IR e nas imagens providas da MEV.

De maneira geral, tanto as células resistentes quanto as sensíveis ao fluconazol e a terbinafina não apresentaram variações significativas no seu potencial zeta no tempo 0 a 24h, sugerindo que a ação provavelmente não envolve potenciais elétricos.

Dessa forma, considerando que tanto o fluconazol quanto a terbinafina têm seus mecanismos de ação na membrana celular, embora sejam em etapas diferentes, e que a fração de polifenóis tem sua possível ação na parede fúngica,

algumas hipóteses podem ser criadas: i) Uma delas é que, no sinergismo, há um aumento da penetração intracelular de terbinafina e fluconazol facilitada pela ação da fração WIF na parede celular. Ainda assim, por ser uma fração de composição complexa, pode ter mais de um mecanismo de ação; ii) Embora o ensaio da bomba de efluxo não tenha dado resultado positivo especificamente para a bomba ABC, outras bombas existem (CLARK *et al.*, 1996) e é possível que exista uma inibição por meio da fração de polifenóis para que os antifúngicos comerciais permaneçam mais tempo dentro da célula fúngica, causando danos; iii) Além disso, como sabe-se que existe uma interação entre esses fármacos, há a possibilidade de que o mecanismo de resistência dos fungos não esteja reconhecendo as estruturas moleculares dos dois fármacos, pois estes encontram-se associados, complexados.

Entretanto, uma avaliação mais aprofundada acerca do comportamento dos polifenóis de *U. tomentosa* após o período de tratamento, assim como a avaliação do princípio ativo na fração WIF, podem esclarecer alguns dos resultados obtidos e surgem como perspectivas de trabalhos futuros.

5. CONCLUSÕES

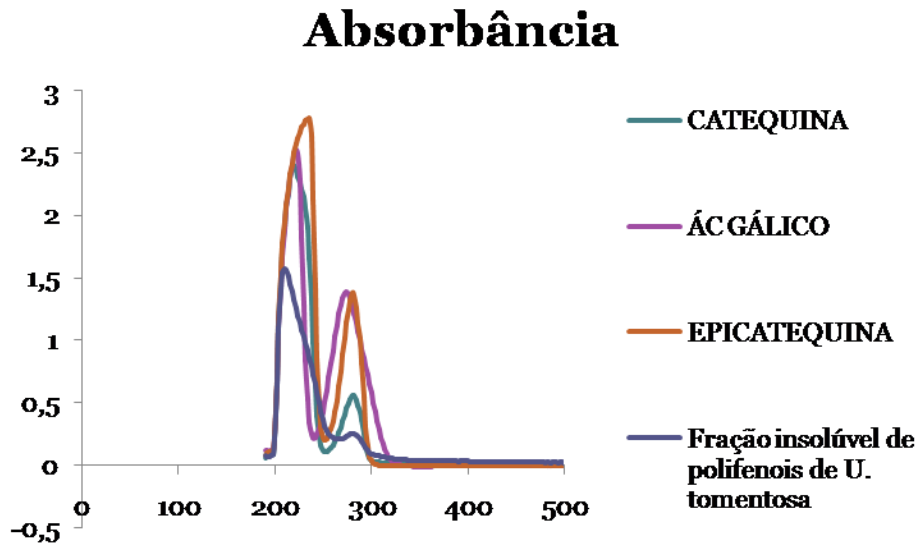
- I. O perfil químico do extrato das cascas do caule de *Uncaria tomentosa* foi analisado por CLAE-PDA e mostrou estar de acordo com o perfil característico da espécie.
- II. Frações compostas majoritariamente por polifenóis através de técnica de precipitação foram obtidas, sendo divididas em frações solúveis e insolúveis em água. O processo de separação em fase sólida polimérica empregado propiciou a obtenção de uma fração purificada em alcalóides oxindólicos e triterpenos, separadamente.
- III. As frações solúveis e insolúveis em água foram caracterizadas mediante CLAE-PDA, método da vanilina, UV e FT-IV. As frações solúveis mostraram ser compostas majoritariamente por polifenóis de baixa massa molecular. Já a fração insolúvel por polifenóis de alta massa molecular, com indícios de polímeros de catequina.
- IV. Através do ensaio cometa, foi avaliado o efeito citotóxico e genotóxico da fração insolúvel, solúvel e do extrato de *U. tomentosa* e nenhum deles mostrou ter afetado os leucócitos em concentrações até 400 µg/mL.
- V. O extrato e as frações de *U. tomentosa* avaliados na determinação da concentração inibitória mínima têm um potencial efeito antifúngico, destacando-se o resultado apresentado pela fração insolúvel de polifenóis frente a cepas resistentes a fluconazol e terbinafina de *Candida krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.
- VI. A associação da fração de polifenóis de *U. tomentosa* à terbinafina promove sinergismo na maioria dos isolados testados, enquanto que com fluconazol apresenta sinergismo na metade deles. Nas outras cepas apresenta efeito aditivo.
- VII. Mediante caracterização físico-química entre os polifenóis e antifúngicos comerciais, interações intermoleculares puderam ser observadas através das

técnicas de DSC e FT-IV. O teste do potencial zeta foi conclusivo, evidenciando não haver reações iônicas.

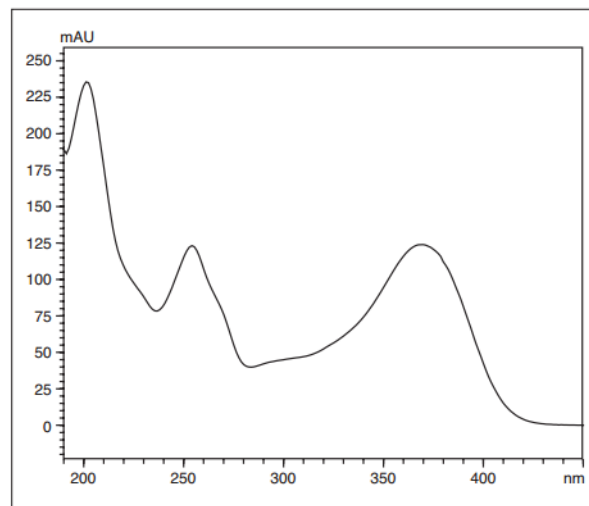
VIII. A fração insolúvel em água (WIF) de *U. tomentosa* apresentou indícios de atividade sobre a parede celular fúngica, conforme avaliação do teste do sorbitol. O teste da bomba de efluxo sugere não envolver bombas do tipo ABC. Através da análise em microscópio eletrônico observou-se alterações morfológicas marcantes nos fungos tratados com WIF, WIF:TRB e WIF:FLZ. No teste da composição química do pseudomicélio de *C. krusei* tratados com WIF e WIF:TRB pelo método de FT-IV, alterações nas regiões correspondentes a proteínas e polissacarídeos puderam ser observadas, diferentemente do tratado com TRB sozinha. O tratado com WIF:FLZ não apresentou alterações significativas.

ANEXOS

Anexo 1. Dados de análise por UV

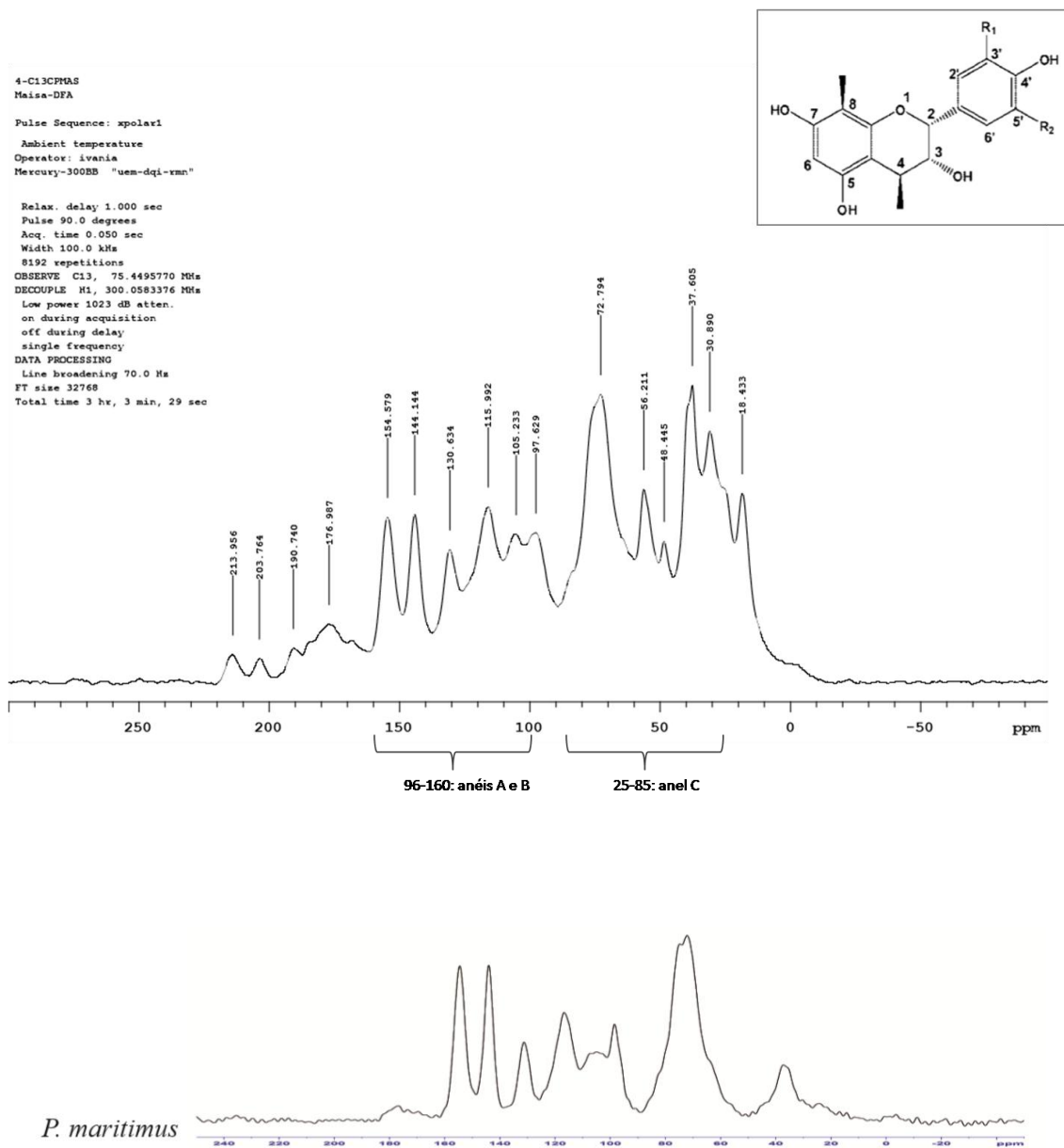


Legenda. Dados práticos de UV-vis de padrões de catequina, ácido gálico e epicatequina e da fração insolúvel de polifenóis de *U. tomentosa*, com máximos de absorção em 210-260 nm e 270-280 nm.



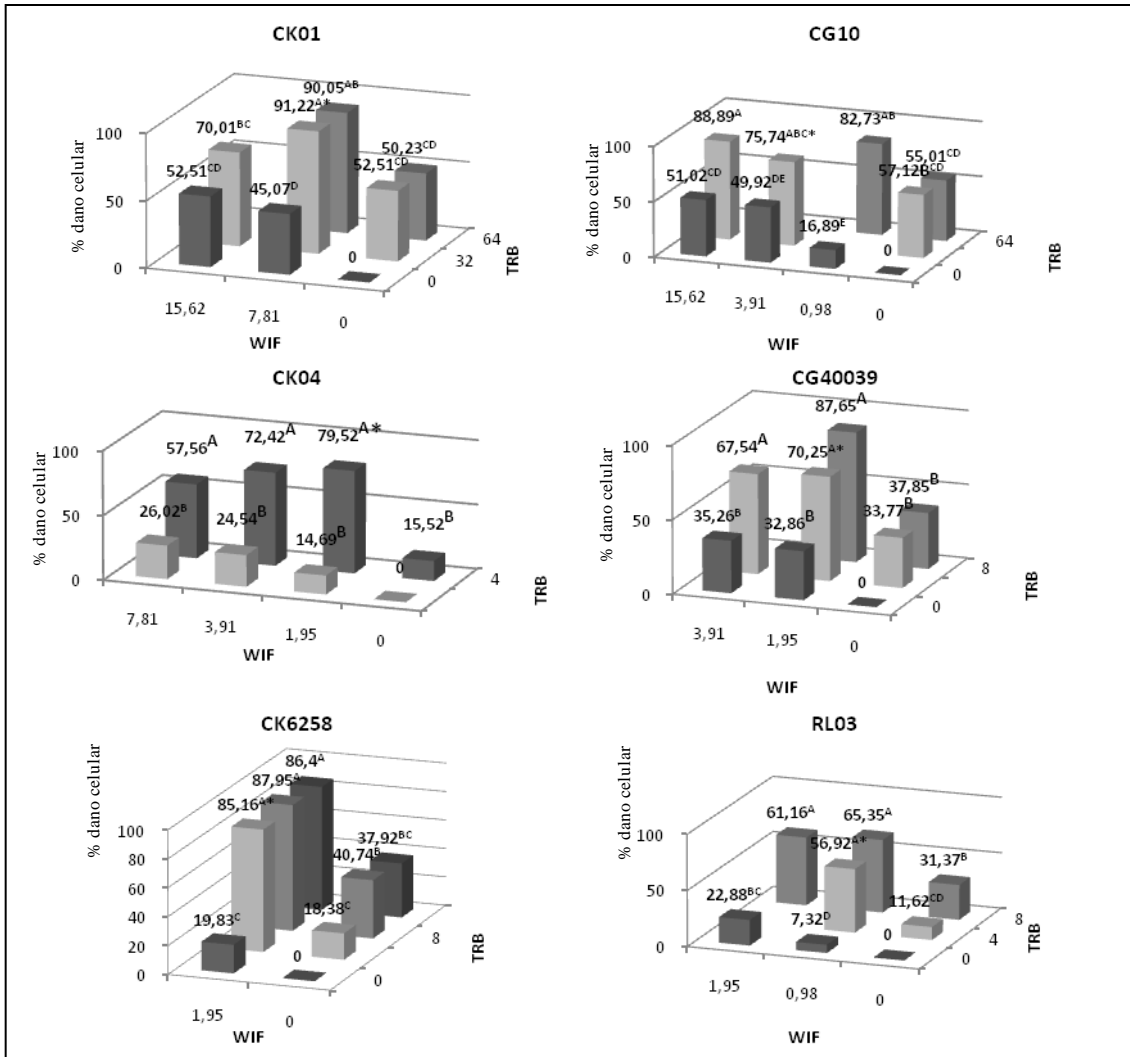
Legenda: UV-VIS absorption spectrum of quercetin, showing absorption maxima in 250-260 nm and 370 nm. (fonte: US Pharmacopeia USP32-NF27).

Anexo 2. Espectro de ^{13}C -RMN em estado sólido da fração insolúvel de cascas de *U. tomentosa*

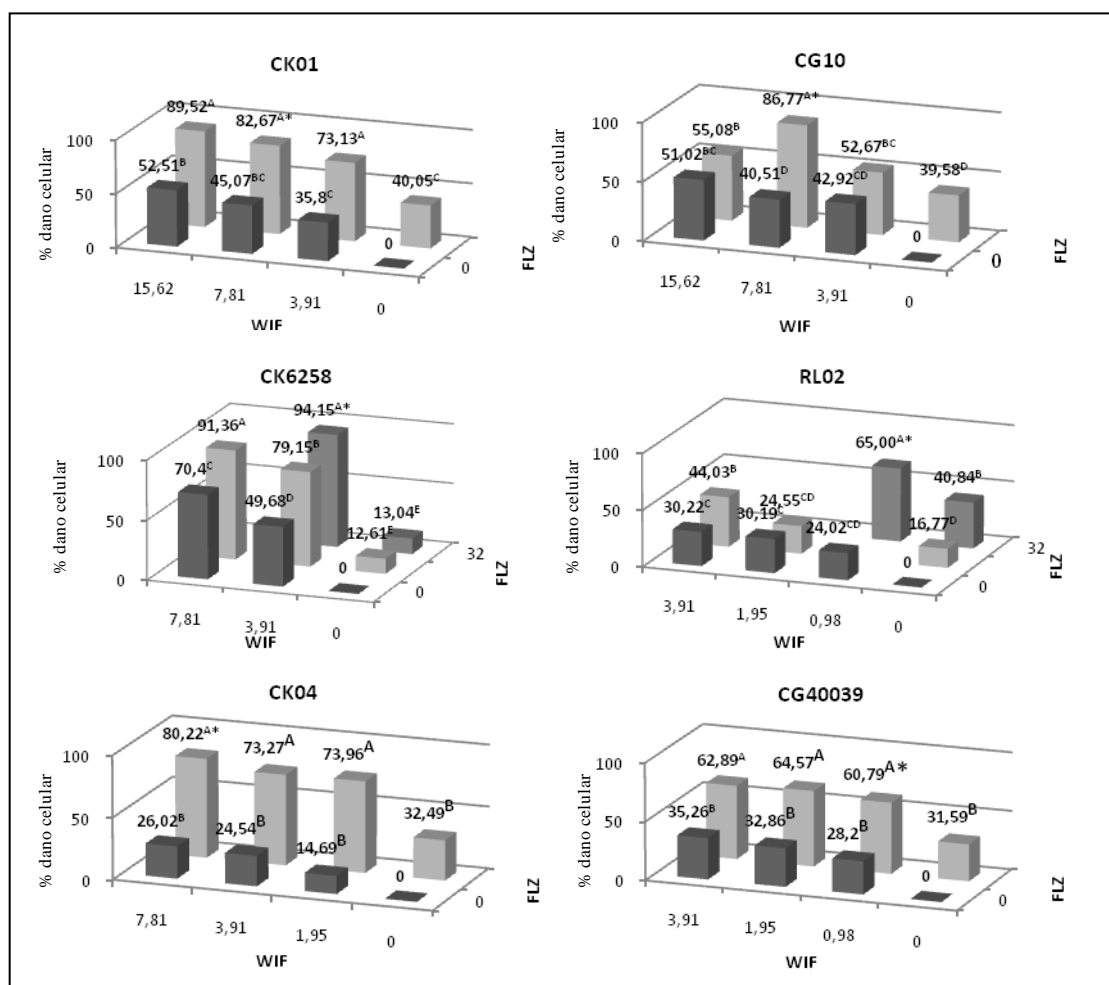


Legenda. ^{13}C NMR solid-state spectra comparison between a) water insoluble fraction from *Uncaria tomentosa* barks and b) *Pinus maritimus* proanthocyanidins. Fonte *P. maritimus*: (Navarrete *et al.*, 2011)

Anexo 3. Gráficos do sinergismo

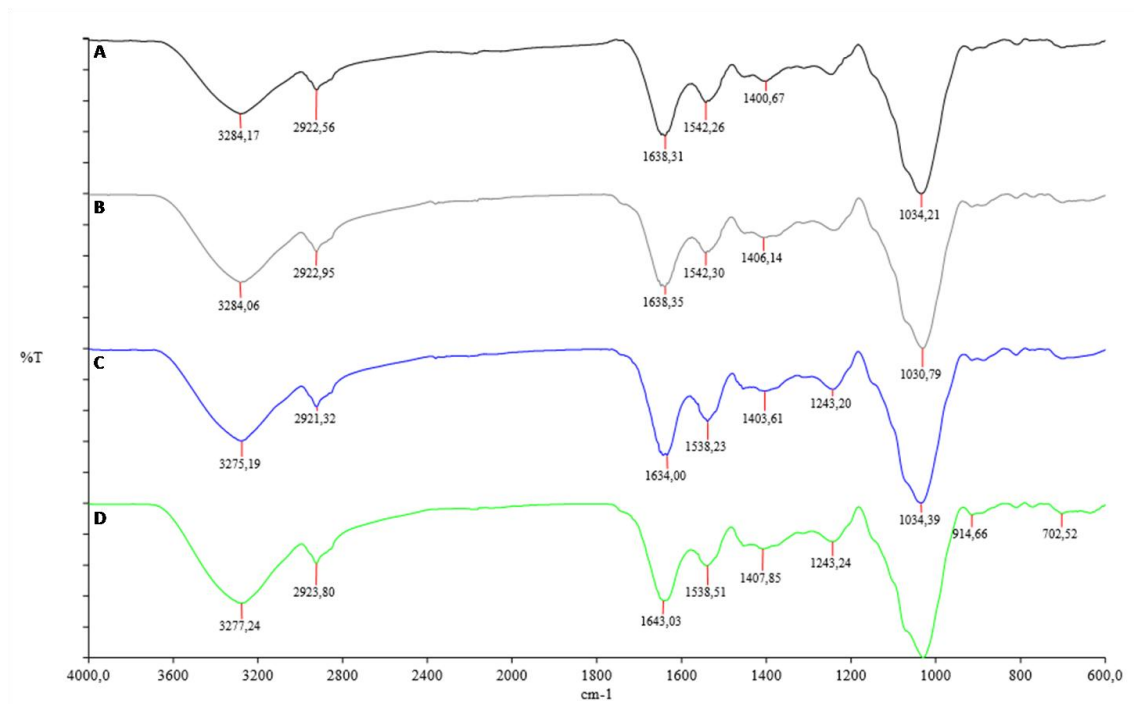


Legenda. Porcentagem de dano celular dos isolados medido por MTT no ensaio checkerboard frente a WIF e TRB sozinhas e em combinação. O eixo horizontal demonstra a concentração de WIF e no eixo de profundidade demonstra a concentração de TRB. O eixo vertical representa o dano celular. O código do isolado é mostrado acima de cada gráfico. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.



Legenda. Porcentagem de dano celular dos isolados medido por MTT no ensaio checkerboard frente a WIF e FLZ sozinhas e em combinação. O eixo horizontal demonstra a concentração de WIF e no eixo de profundidade demonstra a concentração de FLZ. O eixo vertical representa o dano celular. O código do isolado é mostrado acima de cada gráfico. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Anexo 4. Dados de FT-IR da combinação WIF:FLZ na composição do pseudomicélio do fungo



Legenda. FT-IR spectra of *C. krusei* pseudomycelia exposed to (A) control without treatment, (B) water insoluble fraction (WIF) from *U. tomentosa*, (C) fluconazole resistant strain, (D) WIF:FLZ 1:2

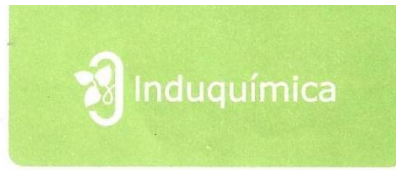
Anexo 5. Dados de potencial zeta

Em um tubo de vidro foi adicionado um inóculo de 1 a 5×10^6 células/mL em 6 mL de salina 10 mM. Este inóculo foi preparado tanto para as células com tratamento quanto para o controle (sem tratamento). As células resistentes a TRB e FLZ foram tratadas com WIF 15,62 $\mu\text{g/mL}$, TRB 32 $\mu\text{g/mL}$, FLZ 64 $\mu\text{g/mL}$ e WIF+TRB (7,81 + 32 $\mu\text{g/mL}$) e WIF+FLZ (7,81 + 16 $\mu\text{g/mL}$). Logo, foram retirados 500 μL do tubo com inóculo e adicionados em outro tubo contendo as amostras já em suas concentrações. Para fins comparativos, foram também utilizadas cepas sensíveis a TRB e ao FLZ. Na determinação do potencial zeta (mV), foi utilizado o equipamento de Zetasizer (Malvern) a 25 °C e as leituras foram realizadas nos tempos 0, 4, 6 e 24h, em triplicata.

SENSÍVEL CK02					SENSÍVEL CK02				
	C +	TRB	WIF	Associação		C +	FLZ	WIF	Associação
0 h	-17,45 ^{ABCD}	-12,95 ^A	-13,61 ^A	-16,50 ^A	0 h	-17,45 ^{ABCD}	-16,51 ^{ABCD}	-17,74 ^{ABCD}	-20,36
4 h	-15,20 ^{ABC}	-12,81 ^A	-14,76 ^A	-15,40 ^A	4 h	-15,20 ^{ABC}	-15,10 ^{ABC}	-18,95 ^{ABCD}	-18,85 ^{ABCD}
6 h	-14,96 ^{AB}	-11,15 ^A	-14,88 ^A	-14,96 ^A	6 h	-14,96 ^{AB}	-14,65 ^A	-20,82 ^D	-21,31 ^D
24 h	-16,65 ^{ABCD}	-16,77 ^A	-11,99 ^A	-13,62 ^A	24 h	-16,65 ^{ABCD}	-14,54 ^A	-19,15 ^{ABCD}	-20,31 ^{BCD}
RESISTENTE CK01					RESISTENTE CK01				
	C +	TRB	WIF	Associação		C +	FLZ	WIF	Associação
0 h	-18,06 ^A	-10,13 ^A	-21,40 ^A	-20,68 ^A	0 h	-18,06 ^A	-18,45 ^A	-21,00 ^A	-22,58 ^A
4 h	-16,78 ^A	-10,67 ^A	-21,85 ^A	-17,55 ^A	4 h	-16,78 ^A	-19,41 ^A	-20,12 ^A	-19,11 ^A
6 h	-14,77 ^A	-12,33 ^A	-20,35 ^A	-18,75 ^A	6 h	-14,77 ^A	-15,28 ^A	-20,91 ^A	-18,67 ^A
24 h	-16,44 ^A	-15,29 ^A	-19,84 ^A	-15,67 ^A	24 h	-16,44 ^A	-15,53 ^A	-18,98 ^A	-23,04 ^A

Legenda. Valores de potencial zeta (mV) em 0, 4, 6 e 24 h para cepas resistentes e sensíveis ao FLZ e TRB. Tratamento: TRB=terbinafina; WIF= water insoluble fraction; FLZ= fluconazol. *Mesmas letras significam resultados estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Anexo 6. Certificação da amostra de *U. tomentosa* gentilmente cedida pelo Laboratório Induquímica S.A.



Chorrillos, 07 de Marzo del 2011

Laboratorios Induquímica S.A. con RUC N° 20101364152, con dirección en Calle Santa Lucila N° 152-154, del Distrito de Chorrillos, Departamento Lima, debidamente representada por el Sr. Cristhian Javier Quintanilla Aurich, identificado con DNI N° 07627533, y la Directora Técnica Q.F. Erica Yukiko Nishihara identificada con C.Q.F.P. N° 00374; exponemos lo siguiente:

Se hace entrega a la señorita Evelyn Maribel Condori Peñaloza, identificada con DNI N° 40251106 y N° Pasaporte : 4793925; la muestra de 5 kg. de Uña de Gato "*Uncaria Tomentosa (Willd)DC*", cabe indicar que es "Muestra destinada a la investigación del programa de Pos graduación de la Universidad Federal Rio Grande del Sur - Brasil, con fin de investigación, sin valor comercial y exenta de riesgo biológico".

Atentamente,

LABORATORIOS INDUQUIMICA S.A.

 INC. CRISTHIAN QUINTANILLA AURICH
 GERENTE GENERAL ADJUNTO
Cristhian J. Quintanilla Aurich
 REPRESENTANTE LEGAL
 DNI: 07627533

LABORATORIOS INDUQUIMICA S.A.

 Q.F. ERICA YUKIKO NISHIHARA
 DIRECTOR TÉCNICO
 C.Q.F.P. 00374
Q.F. Erica Yukiko Nishihara
 DIRECTOR TÉCNICO
 C.Q.F.P.: 00374



REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.L.; ROJAS, P.; MARCELO, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.81(2), p.271–276, 2002.

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

ALARCO, A.M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.700–708, 1999.

AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K.A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v.17, p.921–925, 2010.

ANDERSON, J.B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.547-56, 2005.

ANDES, D.; FORREST, A.; LEPAK, A.; NETT, J.; MARCHILLO, K.; LINCOLN, L. Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance in vivo: fluconazole and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, p.2374–2383, 2011.

AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CIRINO G. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v.54(2), p.453–459, 1991.

AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M. Plant metabolites. Structure and *In Vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platyipoda*. **Journal of Natural Products**, v.52(4), p.679–685, 1997.

ARENDRUP, M.C.; GARCIA-EFFRON, G.; LASS-FLORL, C.; LOPEZ, A.G., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PERLIN, D.S. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.426-439, 2010.

ARUNPRASAD, K.; NARA YANAN, N.; RAJALAKSHMI, G. Preparation and evaluation of solid dispersion of terbinafine hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research**, v.3(1), 2010.

ASHLEY, E.S.D. Pharmacology of azole antifungal agents. In: Ghannoum, M.A. e Perfect, J.R. (Ed.). Antifungal therapy. 1 ed. New York: **Informa Healthcare USA**, Cap 12, p.199-218, 2010.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; ALVES, C.T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; SANTOS-BUELGA C. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.41–45, 2013.

BELOFSKY, G. Metabolites of the "smoke tree", *Dalea spinosa*, potentiate antibiotic activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.261-264, 2006.

BORRÉ, G. Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa*. Dissertação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 2010. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61561/000774746.pdf?sequence=1> acessado em 15/11/13

BOTERO, A.E.C. Trends on the use of bioreagents in mineral flotation. **Revista Escola de Minas**, v.61, p.57-61, 2008.

BRUNETON, J. Farmacognosia - Fitoquímica Plantas Medicinales. 2 ed. España: Editorial Acríbia S.A., p.365-400, 2001.

CALDERONE, R.A. Introduction and historical perspectives. *Candida* and Candidiasis. **American Society Microbiology**. p.15-25, 2002.

CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p. 550-563, 2002.

CARRILLO-MUNOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDOS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v.19, p.130-9, 2006.

CARVALHO, E.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. **Analytica Chimica Acta**, v.513, p. 97-101, 2004.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.23, p.39-49, 2006.

CHEN, S.; LI, S.; LIU, Z. Comparison of the effects of three different anti-fungus drugs on *Candida albicans* of murine vaginal mucosa. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 27, p.209-212, 2007.

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

CLARK, F.S.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C.A.; GOW, N.A.R. Correlation between Rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: possible role for drug efflux in drug resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, p.419–425, 1996.

CLSI: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. A National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.174-181, 2012.

DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. Methods in plant biochemistry. **Academic Press**, v. 1, p. 414–418, 1989.

ENDO, E.H.; CORTEZ, D.A.G.; 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*. **Research in Microbiology**, v.161, p.534-540, 2010.

EUCAST: Definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.398-405, 2008.

FATIMA, I.; AHMAD, I.; ANIS, I.; MALIK, A. Isatinones A and B, New Antifungal Oxindole Alkaloids from *Isatis costata*. **Molecules**, v. 12, p.155-162, 2007.

FICKEL, J.; PITRA, C.; JOEST, B.A.; HOFMANN, R.R. A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122, p.225-229, 1999.

FORTÚN, J.; MARTÍN-DÁVILA, P.; NAVAS, E.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; PINTADO, V.; COBO, J, *et al.* Changes in the epidemiology of tuberculosis: the influence of international migration flows. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.29(9), p.654–659, 2011.

FUCHS, B.B.; TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R.; MYLONAKIS, E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p.2929-2936, 2007.

FUKUDA, E.K.; VASCONCELOS, A.F.D.; MATIAS, A.C.; SILVA, M.L.C. Polissacarídios de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Ciências Agrárias**, v.30 (1), p. 117-134, 2009.

GALINDO, T.; PEREIRA, R.; FREITAS, A.; SANTOS-ROCHA, T.; RASTEIRO, M.; ANTUNES, F. Toxicity of organic and inorganic nanoparticles to four species of white-rot fungi. **Science of the Total Environment**, v.458, p.290–297, 2013.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product Reports**, v.21, p.263-277, 2004.

GIL-LAMAIGNERE, C.; MÜLLER, F. Differential effects of the combination of caspofungin and terbinafine against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida kefyr*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.520–523, 2004.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v.66, p.89–98, 2005.

GONZALES, G.F.; VALERIO, L.G. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.6(5), p.429–444, 2006.

HAGERMAN, A.E.; RICE, M.E.; RITCHARD, N.T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16-(4-8) catechin (procyanidin). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p.2590-2595, 1998.

HEITZMAN, M.E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v.66, p.5–29, 2005.

HEITZMANN, M.E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (RUBIACEAE). **Phytochemistry**, v.66, p.5-29, 2005.

HEMINGWAY, S.; PHILLIPSON, J. Alkaloids from american species of *Uncaria* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.26, p.113, 1974.

ISHIDA, K.; PALAZZO J.C., DE MELLO; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.942–949, 2006.

JOBSTL, E.; O'CONNELL, J.; FAIRCLOUGH, J.P.A.; WILLIAMSON, M.P. Molecular model for adstringency produced by polyphenol/protein interactions. **Biomacromolecules**, v.5, p.942-949, 2004.

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

KAISER, S.; DIETRICH, F.; RESENDE, P.E.; VERZA, S.G.; MORAES, R C.; MORRONE, F.B.; BATTASTINI, A.M.O.; ORTEGA, G.G. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by cell incubation and cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. **Planta Medica**, 2013b.

KAISER, S.; VERZA, S.G.; MORAES, R.C.; PITTOL, V.; PEÑALOZA, E.M.C.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G. Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides

from cat's claw bark by Box-Behnken design. **Industrial Crops and Products (Print)**, v.48, p.153-161, 2013a.

KAKEYA, H.; MIYAZAKI, T.; MIYAZAKI, Y.; KOHNO, S. A zole resistance in *Candida* spp. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**. v.44 (2), p.87-92, 2003.

KATIYAR, S.K.; EDLIND, T.D. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida knusei*. **Medical Mycology**, v.39, p.109–16, 2001.

KHAN, A.; AHMAD, A.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.52, p.1127-1132, 2010.

KLOBUCNIKOVÁ V.; KOHUUT, P.; LEBER, R.; FUCHSBICHLER, S.; SCHWEIGHOFER, N.; TURNOWSKY, F.; HAPALA, I. Terbinafine resistance in a pleiotropic yeast mutant is caused by a single point mutation in the ERG1 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.309, p.666–671, 2003.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial *screening* of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.309-312, 2005.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Toward more effective antifungal therapy: the prospects of combination therapy. **British Journal of Haematology**, v.126, v.165–175, 2004.

KRISTA, A.K. Therapeutic Review: Terbinafine. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.21, p 181–185, 2012.

LARONE, D.H. Medically Important Fungi: **A Guide to Identification. 4 edition**. American Society Medical. 2002.

LASS-FLOR, C., PERKHOFER, S., AND MAYR, A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. **Mycoses**, v. 53, p.1-11, 2010.

LAUS, G.; BRÖSSNER, D.; KEPLINGER K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.45(4), p.855–860, 1997.

LEMAIRE, I.; ASSINEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D.V.; ARNASON, J.T. Stimulation of interleukin-1 and-6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v.64(2), p.109–115, 1999.

LENZI, R.M.; CAMPESTRINI, L.H.; OKUMURA, L.M.; BERTOL, G. KAISER, S.; ORTEGA, G.G.; GOMES, E.M.; BOVO, F.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; STEVAN-HANCKE, F.R.; MAURER, J.B.B. Effects of aqueous fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. on macrophage modulatory activities. **Food Research International**, v.53, p.767-779, 2013.

LORTHOLARY, O.; DUPONT, B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p.477-504, 1997.

LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N.J.; GRIMMER, H.R.; WARMINKI, E.E.; WILLIAMSON, M.P.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenols, adstringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry**, v.37, p.357-371, 1994.

MÉAN M., MARCHETTI O., CALAN DRA T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 12, p.204, 2008.

MONDELLO, F.; DE BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A.; SALVATORE, G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Disease**, v.6, p.158 – 165, 2006.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIN, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p.892-896, 2005.

MOORE, C.B.; WALLS, C.M.; DENNING, D.W. *In vitro* activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1882–5, 2001.

MORRISSEY, J. P.; OSBOURN, A. E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenic. **Microbiology and Molecular Biology**, v.63, p.703-708, 1999.

MSHVILDADZE, V.; FAVEL, A.; DELMAS, F.; ELIAS, R.; FAURE, R.; DECANOSIDZE, Q.; KEMERTELIDZE, E.; BALANSARD, G. Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*, **Pharmazie**, v.55(4), p.325–326, 2000.

MUKHERJEE P.K.; SHEEHAN D.J.; HITCHCOCK C.A.; GHANNOUM M.A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Microbiology Reviews Clinical**, v.18, p.163–194, 2005.

MUKHERJEE, P.K.; LEIDLICH, S.D.; ISHAM, N.I.; LEITNER.; N.S.; RYDER, M. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, p.82–86, 2003.

NAKAMURA, A.C.V.; ISHIDA, A.K.; FACCIN, A.L.C.; DIAS FILHO, A.B.P.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, v.155, p.579–586, 2004.

NAVARRETE, P.; PIZZI, A.; BERTAUD, F.; RIGOLET, S. Condensed tannin reactivity inhibition by internal rearrangements: detection by CP-MAS ¹³C NMR . Maderas. **Ciencia y tecnología** v.13 p.59-68, 2011.

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

NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; HAJLAOUI, H.; VALENTIN, E.; BAKHROUF, A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.29, p.81– 88, 2010.

OLUWATUYI, M.; KATZ, G.W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinallis*. **Phytochemistry**, v.65, p.3249-3254, 2004.

PAIVA, L.C.A.; RIBEIRO, A.; PEREIRA, J.V.; OLIVEIRA, N.M.C. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.19(2A), p.423–428, 2009.

PAVEI, C.; BORRÉ, G.L.; KAISER, S.; ORTEGA, G.G. Alkaloid isomerization induced by spray drying of *Uncaria tomentosa* bark extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p.608–612, 2011.

PAVEI, C.; KAISER, S.; BORRÉ, G.L.; ORTEGA, G.G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.33, p.1551–1561, 2010.

PAVEI, C.; KAISER, S.; VERZA, S.G.; BORRÉ, G.L.; ORTEGA, G.G. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.62, p.250–257, 2012.

PEÑALOZA, E.M.C. Variabilidade do perfil químico em *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. segundo origem geográfica, altitude e sazonalidade Dissertação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 2013.

PILARSKI, R.; ZIELINSKI, I.H.; CIESIOKA, D.; GULEWICZ, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of ethnopharmacology**. v.104(1), p.18–23, 2006.

PINJON, E.; JACKSON, C.J.; KELLY, S.L. Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased CdCDR1 and CdCDR2 expression. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, p.1312–8, 2005.

PINTO E SILVA, A.T., COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; SILVA-DIAS, A.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. **FEMS Yeast Research**, v.9, 626-633, 2009.

POLLITO, P.A.Z.; TOMAZELLO, M. Wood anatomy of *Uncaria guianensis* and *U. tomentosa* (*Rubiaceae*) from the state of Acre, Brazil. **Acta Amazonica**, v.36, p.169–175, 2006.

QIAO, J.; WEI, L.; RUOYU, L. Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.49, p.157-163, 2008.

REIS, S.R.I.; VALENTE, L.M.; SAMPAIO, A.L.; SIANI, A.C.; GANDINI M.; AZEREDO, E.L. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International Immunopharmacology**, v.8(3), p.468-476, 2008.

RODRIGUES, G. B. Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalúminio ftalocianina em nanoemulsão. Tese de doutorado da USP, 2012.

SAGHROUNI, F.; BOUGMIZA, J.; ABDELJELIL, B.; YACOUB, A.; KHAMMARI, I.; FATHALLAH, A.; MTIRAOURI, A.; SAID, B.M. Epidemiological trends in invasive candidiasis: Results from a 15-year study in Sousse region, Tunisia. **Journal de Mycologie Médicale**, v.21, p.123-129, 2011.

SAMARANA YAKE, Y.H.; SAMARANA YAKE, L.P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v.41, p. 295-310, 1994.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**, v.143, p.405-16, 1997.

SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI J.L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, p.2378-86, 1995.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, p.668-79, 2005.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M.; ALBAN, J.; GALAN DE MERA, A.; VICENTE ORELLANA, J. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57(3), p.183-187, 1997.

SANTOS, R.D.T.; Perfil de susceptibilidade e resultados da associação de antifúngicos: um novo método. Dissertação em Microbiologia Aplicada - Universidade de Lisboa- Faculdade de Ciências - Departamento de Biologia Vegetal, 2010.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5 ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFRGS, Cap 24, p. 615-656, 2003.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, p.21-40, 2001.

SEGAL, R.; KRITZMAN, A.; CIVIDALLI, L.; SAMRA, Z.; DAVID, M. Treatment of *Candida* nail infection with terbinafine. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 35, p.958–961, 1996.

SHEPPARD, D.; LAMPIRIS, H.W. Farmacologia Básica e Clínica. Agentes antifúngicos. **McGraw-Hill**, v.10, p.707-714, 2008.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. RJ: **Guanabara Koogan**, 2004.

SIEBERT, K.J.; TROUKHANOVA, N.V.; LYNN, P.Y. Nature of polyphenol-protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.80-85, 1996.

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, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. Federation of European Microbiological Societies - **FEMS Microbiol Rev** v.36, p.288–305, 2011.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SEVERI, J.A.; LEE, K.; PREECHASUTH, K.; SANTOS, E.; NEIL, A.R.; GOW; MUNRO, C.A.; VILEGAS, W.; PIETRO, R.C. L.R. Anti-*Candida* targets and cytotoxicity of *Casuarinin* isolated from *Plinia cauliflora* leaves in a bioactivity-guided study. **Molecules**, v.18, p.8095-8108; 2013.

STUPPNER, H.; STURM, S.; KONWALINKA, G. HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Chromatographia**, v.34(11-12), p.597–600, 1992.

THOO, Y.Y.; HO, S.K.; LIANG, J.Y.; HO, C.W.; TAN, C.P. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, p.290–295, 2010.

UPPULURI, P.; NETT, J.; HEITMAN, J.; ANDES, D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.1127-1132, 2008.

VAN DER REST, M.; KAMMINGA, A.; NAKANO, A.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiology Review**, v.59, p.304-322, 1995.

VANDEN BOSSCHE H.; MARICHAL, P.; GORENS, J.; COENE, M.C.; WILLEMSSENS, G.; BELLENS, D.; ROELS, I.; MOEREELS, H.; JANSEEN, P.A. Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. **Mycoses**, v.32, p.35-52, 1989.

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

VERZA, S.G.; SILVEIRA, F.; CIBULSKI, S.; KAISER, S.; FERREIRA, F.; GOSMANN, G.; ROEHE, P.M.; ORTEGA, G.G. Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by uplc/q-tof-ms of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.3113-3118, 2012.

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

WHITE, T.C.; MARIE, C. Genetic basis of antifungal drug resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v.3, p.163-169, 2009.

YAN, Z.; HUA, H.; XU, Y.; SAMARANAYAKE, L.P. Potent antifungal activity of pure compounds from traditional chinese medicine extracts against six oral *Candida* species and the synergy with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012.

YOSHIO, O.; KOUJI, G. Antigenicity of *Candida tropicalis* strain cells cultured at 27 and 37 1C. **Immunology Medical Microbiology**, v.46, p.438–443. 2006.

YU, J.; RUOYU, L.; ZHANG, M.; LIU, L.; WAN, Z. *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblasto mycosis in China. **Medical Mycology**, v.46, p.745–747, 2008.

ZACCHINO, A.S. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. **Oxfordshire**, p1-41, 2003.