



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSANA SERPA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FLAVONÓIDES EM
CANDIDA SPP. E AVALIAÇÃO DE SINERGISMO COM
FLUCONAZOL**

Londrina
2011

ROSANA SERPA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FLAVONÓIDES EM
CANDIDA SPP. E AVALIAÇÃO DE SINERGISMO COM
FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Furlaneto.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S486a Serpa, Rosana.

Atividade antifúngica de flavonoides em *Candida* spp. e avaliação de sinergismo com fluconazol / Rosana Serpa. – Londrina, 2011; 87 f. : il.

Orientador: Márcia Crsitina Furlaneto.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Candida* – Tratamento – Teses. 2. Flavonóides – Aspectos biológicos – Teses. 3. Fungos patogênicos – Teses. 4. Micoses fungóides – Teses. 5. Virulência (Microbiologia) – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 616.934

ROSANA SERPA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FLAVONÓIDES EM *CANDIDA* SPP. E
AVALIAÇÃO DE SINERGISMO COM FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Andréa Diniz
UEM – Maringá – PR

Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto-Maia
UTFPR – Londrina – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Nas nossas vidas, mais importante do que as conquistas, são as pessoas que cruzam nossos caminhos. Todas elas, de uma forma ou de outra, deixam marcas profundas. Reconstróem nosso caráter, renovam nossas esperanças e fazem com que a gente acredite que sim, as coisas podem, devem e vão ser feitas. Passados estes dois anos de aprendizado, de conhecimento e de reconstrução dos meus valores, eu agradeço:

Primeira e especialmente, à professora Márcia Cristina Furlaneto, por ter me dado a chance de trabalhar em seu grupo de pesquisa, por ter acreditado e confiado em mim, por ter me dado espaço, e por me mostrar, principalmente, como é ser um profissional ético, responsável, comprometido com o ensino e com a pesquisa. Por ter tido paciência, carinho e dedicação comigo, e principalmente, por ter me orientado e me guiado nestes dois anos.

À professora Luciana Furlaneto-Maia, por ter sempre dado sugestões oportunas e enriquecedoras a este trabalho, por ter me mostrado que eu sempre tenho capacidade e a possibilidade de melhorar, e por fazer parte das bancas deste trabalho.

À professora Andrea Diniz, por ter tirado todas as minhas dúvidas, sempre com muita disposição e carinho, e por fazer parte das bancas de avaliação deste trabalho.

À professora Suzana Nixdorf, pelo sorriso iluminado, pela disposição em ajudar sempre, pelas excelentes colocações referentes a este trabalho e por fazer parte de uma das bancas deste trabalho.

À professora Dr^a Marcia de Souza Carvalho Melhem, por ter gentilmente cedido as cepas de coleção utilizadas neste trabalho.

À professora Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, por ter me aberto espaço para as análises microscópicas deste trabalho, por ter sentado comigo e tirado todas as minhas dúvidas, sempre com muita paciência e dedicação. Ao Oswaldo, agradeço pela solicitude no preparo das amostras e na obtenção das fotos, e pelos bons tempos de convivência.

À colega Viviana Cely, principalmente, pela ajuda inestimável no uso dos equipamentos e pela solicitude e prontidão sempre quando eu precisei. Ao Júnior,

primeiramente pela ajuda prática e troncos de árvore quebrados, mas principalmente por me entender e me ajudar em todos os aspectos práticos deste trabalho.

Aos professores Galdino Andrade Filho, Maria Helena Fungaro e Maria Angélica Watanabe, pela disponibilidade de materiais e equipamentos em seus laboratórios. Aos colegas dos laboratórios vizinhos, em especial à Lara, pela disposição em ajudar, sempre.

Aos colegas da turma de mestrado, em especial à Ana Flávia, pelos momentos de conversa, incentivo e descontração, que sempre farão parte saudosa da minha história.

Ao Osvaldo, à Jussevânia, à Claci, à Lara, ao João, ao Ricardo, à Nalva e a todos os funcionários que em um momento ou outro me auxiliaram na conclusão deste trabalho.

À CAPES e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina.

Aos amigos e às pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

E finalmente aos meus amigos de laboratório:

Eu pensei em uma maneira de direcionar os agradecimentos pessoalmente a cada um. Entretanto, não há como desvincular o grupo inteiro, pois todos são igualmente importantes e significativos na minha vida. Por toda a ajuda sempre prestada, pelas discussões filosóficas, pelas risadas, pelas cantorias, pelas descontrações, pelas orientações, pelas festas, pelas noites viradas nas curvas, pelos serões montando experimento, por toda a ajuda na execução dos experimentos, e por tudo de bom que acrescentaram na minha vida. Então, eu declaro meus mais sinceros agradecimentos à Alane, à Ana Flávia, ao Daniel, à Helena, ao Henrique, à Katia, ao Luiz, ao Marcelo, à Marcinha, à Thais e à Vivi. E em especial à Manu, por ter assumido este trabalho como se fosse seu, por ter me ajudado, e muito, na parte prática e teórica deste experimento e por ter me mostrado, principalmente, o quanto as amizades valem a pena. Bem dizem que os amigos são os irmãos que a gente escolhe.

Meus mais sinceros agradecimentos!

“Não há desconhecidos no mundo, há apenas amigos á espera de serem encontrados.” (Autor desconhecido).

“... e não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”
Jean Cocteau

SERPA, Rosana. **Atividade antifúngica de flavonóides em *Candida* spp. e avaliação de sinergismo com fluconazol**. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos envolvidos em infecções em humanos. Diante da emergência de espécies não-*albicans* e a ocorrência de resistência intrínseca e adquirida destas leveduras, têm se observado um aumento no interesse pela busca de novos antifúngicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos flavonóides crisina e baicaleína frente a *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima, bem como determinar a queda de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹), analisar a influência destes flavonóides na curva de crescimento e tempos de geração, determinar o potencial sinérgico da baicaleína com o fluconazol e analisar as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais da baicaleína, do fluconazol e da combinação sinérgica entre eles, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados mostraram que a baicaleína e a crisina apresentaram valores de IC50 entre 800 e 50 µmol.L⁻¹, para as três espécies de *Candida* testadas. A análise da queda no número de UFC.mL⁻¹ mostrou que, na máxima concentração testada, de 1000 µmol.L⁻¹, houve queda de 2 log para uma das *C. albicans* testadas, e de 1 log para as demais cepas/isolados testados. A análise das curvas de crescimento mostrou que a baicaleína foi capaz de prolongar a fase lag das três espécies, atrasando entre 6 e 12 horas, quando comparados ao controle. Este prolongamento na fase lag não foi observado para o tratamento com crisina. Ainda, a baicaleína foi capaz de aumentar os tempos de geração das três espécies testadas, sendo diferentes entre isolados e cepas de cada espécie. Já a crisina foi capaz de aumentar os tempos de geração de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, sem diferença significativa para *C. tropicalis* (p<0,001), quando comparados aos controles. A análise da MEV revelou que as três espécies responderam de maneira diferenciada aos tratamentos. O tratamento com o fluconazol manteve as células agrupadas, sem a presença de hifas, quando comparados aos controles. A baicaleína não mostrou diferença quanto a presença de hifas e blastoconídeos, mas o tratamento resultou em uma maior produção de material extracelular, quando comparados aos controles. Apenas para *C. tropicalis*, no tratamento com baicaleína as células mostraram-se mais alongadas do que no controle. Já na combinação sinérgica entre baicaleína e fluconazol, houve produção muito acentuada de material extracelular, quando comparada aos outros tratamentos. Em *C. tropicalis*, a presença do fluconazol, associado à baicaleína, foi capaz de inibir a diferenciação na forma filamentosa. Os dados obtidos mostram o potencial da baicaleína como agente antifúngico e sua eficiência como agente efetor de sinergismo com o fluconazol sobre cepas e isolados de diferentes espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. *Candida parapsilosis*. Atividade antifúngica. Fluconazol. Flavonóides. Baicaleína. Crisina.

SERPA, Rosana. **Antifungal activity of flavonoids in *Candida* spp. and evaluation of synergism with fluconazole.** 2011. 87p. Dissertation (Masters in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Species from the genus *Candida* are the main fungal pathogens involved in human infections. Considering the emergency of non-*albicans* species and the occurrence of intrinsic and acquired resistance of these yeasts, it's been observed a growing interest in the search for new antifungal agents. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the flavonoids baicalein and chrysin against *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, by the determination of the Minimal Inhibitory Concentration, as well as to determine the decreasing of the Colony Forming Units (UFC.mL⁻¹), analyze the influence of these flavonoids in the growth curves and generation times, evaluate the synergistic potential of baicalein with fluconazol and analyze the possible morphological and ultra-structural alterations of the baicalein, fluconazol and of the synergic combination of them, through scanning electron microscopy (SEM). The data showed that the baicalein and the chrysin presented IC50 values between 800 and 50 µmol.L⁻¹, for all three *Candida* species tested. The analysis of decrease in the number of CFU.mL⁻¹ showed that, in the maximum concentration tested (1000 µmol.L⁻¹), there was a decrease of 2 log for one of the tested *C. albicans*, and of 1 log for the other strain/isolate tested. The analysis of the growth curves showed that the baicalein was capable of slowing down the lag phase of the three species, retarding between 6 and 12 hours when compared to the control. This retard in the lag phase was not observed in the treatment with chrysin. Still, the baicalein was capable of increase the generation times of the three tested species, with differences between isolates and strain from each species. The chrysin was capable of increasing the generation times of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, but not to *C. tropicalis* (p<0,001), when compared to the controls. The SEM analysis showed that the three species responded at different manners to the treatments. The treatment with fluconazol kept the cells clustered, without the presence of hyphae, when compared to the controls Baicalein did not show difference regarding to the presence of hyphae and blastoconidia, but the treatment presented a higher production of extra-cellular material when compared to the controls. Only for *C. tropicalis*, in the treatment with baicalein, the cells were more elongated than in the control. In the synergic combination between baicalein and Fluconazol, there was a high production of extra-cellular material when compared to the other treatments. In *C. tropicalis* the presence of fluconazol associated with baicalein was capable of inhibit the differentiation in the filamentous form. The obtained data showed the potential of the baicalein as antifungal agent and its efficiency as an agent of synergism with fluconazol on the strains and isolates of different species of *Candida*.

Keywords: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. *Candida parapsilosis*. Antifungal activity. Fluconazole. Flavonoids. Baicalein. Chrysin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1** – Fórmula estrutural do Fluconazol22
- Figura 2** – Fórmula estrutural da Baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona)27
- Figura 3** – Fórmula estrutural da Crisina (5,7-dihidroxiflavona).....29

Parte I

- Figura 1** – Representação esquemática do teste de sinergismo em meio solidificado.....50
- Figura 2** – Redução de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) após incubação na ausência e presença de baicaleína (concentrações obtidas para o IC 50 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.....56
- Figura 3** – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas de *C. albicans* na ausência (controle) e presença de baicaleína.....57
- Figura 4** – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de baicaleína57
- Figura 5** – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. parapsilosis* na ausência (controle) e presença de baicaleína58
- Figura 6** – Análise de sinergismo em meio solidificado, entre fluconazol e baicaleína, para *C. parapsilosis* 153.0760
- Figura 7** – Fotomicrografia eletrônica de varredura de células de *C. albicans* ATCC 64550, cultivadas em RPMI (A), em presença de fluconazol (B), em presença de baicaleína (C), e em presença de fluconazol+baicaleína (D). Aumento de 6000 vezes.....64
- Figura 8** – Fotomicrografia eletrônica de varredura de células de *C. tropicalis* 170.06, cultivadas em RPMI (A), em presença de fluconazol (B), em presença de baicaleína (C), e em presença de fluconazol+baicaleína (D). Aumento de 6000 vezes.....65
- Figura 9** – Fotomicrografia eletrônica de varredura de células de *C. parapsilosis* 153.07, cultivadas em RPMI (A), em presença de

fluconazol (B), em presença de baicaleína (C), e em presença de fluconazol+baicaleína (D). Aumento de 6000 vezes.....66

Parte II

Figura 1 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas de *C. albicans* na ausência (controle) e presença de crisina80

Figura 2 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de crisina81

Figura 3 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. parapsilosis* na ausência (controle) e presença de crisina81

LISTA DE TABELAS

Parte I

- Tabela 1** – Valores de CIM 50 de fluconazol para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.....52
- Tabela 2** – Valores de CIM 50 de baicaleína para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.....53
- Tabela 3** – Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹) após incubação de 24 h na ausência e presença de baicaleína (concentrações obtidas para o IC 50 e 1000 µmol.L⁻¹) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.....55
- Tabela 4** – Tempos de geração de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* após cultivo em ausência (controle) e presença de baicaleína59
- Tabela 5** – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol, baicaleína e fluconazol+baicaleína sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.....61

Parte II

- Tabela 1** – Valores de CIM 50 de crisina para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*78
- Tabela 2** – Tempos de geração de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* após cultivo em ausência (controle) e presença de crisina83

LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Microgramas por mililitro
μmol^{-1}	Micromolar
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CI	Concentração Inibitória
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
NCCLS	<i>National Committee of Clinical Laboratory Standards</i>
UFC.mL^{-1}	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	GERAL	15
2.2	ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	16
3.2	EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO <i>CANDIDA</i>	17
3.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	19
3.4	RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	21
3.5	SINERGISMO	24
3.6	FLAVONÓIDES	26
3.6.1	Baicaleína.....	27
3.6.2	Crisina.....	28
	REFERÊNCIAS	30
	PARTE I	44
	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE BAICALEÍNA EM CANDIDA SPP. E SINERGISMO COM FLUCONAZOL	44
1	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1	MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>CANDIDA</i> SPP.	46
2.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> SPP. AO FLUCONAZOL	46
2.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BAICALEÍNA – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	47
2.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DA BAICALEÍNA NAS DIFERENTES ETAPAS DE CULTIVO.....	48
2.5	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE SINERGISMO ENTRE BAICALEÍNA E FLUCONAZOL	49

2.6	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA MORFOLOGIA E ARRANJO CELULAR DE <i>CANDIDA</i> SPP	50
2.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
3	RESULTADOS	52
3.1	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DA <i>CANDIDA</i> SPP. AO FLUCONAZOL	52
3.2	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BAICALEÍNA	53
3.2.1	Concentração Inibitória Mínima	53
3.2.2	Avaliação da Ação da Baicaleína nas Diferentes Fases da Curva de Crescimento.....	57
3.3	SINERGISMO COM FLUCONAZOL	59
3.4	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA MORFOLOGIA E ARRANJO CELULAR DE <i>CANDIDA</i> SPP SUBMETIDAS À BAICALEÍNA, FLUCONAZOL E BAICALEÍNA+FLUCONAZOL	63
	REFERÊNCIAS	70
	PARTE II	73
	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CRISINA EM <i>CANDIDA</i> SPP	73
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAIS E MÉTODOS	75
2.1	MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>CANDIDA</i> SPP.	75
2.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA CRISINA	75
2.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DA BAICALEÍNA NAS DIFERENTES ETAPAS DE CULTIVO.....	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1	ATIVIDADE INIBITÓRIA	78
3.2	AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE CRISINA NAS DIFERENTES ETAPAS DE CULTIVO	80
	REFERÊNCIAS	84
4	CONCLUSÃO	87

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos envolvidos em infecções em humanos. *Candida* spp são comensalistas, entretanto, são capazes de causar fungemias quando há alterações no estado fisiológico e no sistema imune do hospedeiro.

Candida albicans é a espécie mais associada a infecções, entretanto, nos últimos anos têm se observado um aumento na ocorrência de espécies não-*albicans*, em casos de infecções fúngicas. Espécies não-*albicans*, entre elas *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, podem expressar de forma diferenciada diversos fatores de virulência, bem como apresentar uma tendência à resistência aos antifúngicos comumente utilizados na rotina clínica.

Diante da emergência de espécies de *Candida* não-*albicans* como patógenos oportunistas, da resistência intrínseca de certas espécies e do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos por espécies naturalmente sensíveis, estratégias relacionadas ao tratamento das infecções provocadas por esses micro-organismos tem se tornado um desafio. O emprego de extratos brutos de plantas e de outros compostos isolados, derivados do metabolismo secundário vegetal, tem merecido a atenção de pesquisadores, já que podem inibir o crescimento fúngico por diferentes mecanismos, quando comparados aos antifúngicos alopáticos.

Uma das alternativas que vem sendo estudada com sucesso na inibição do crescimento destes patógenos é a combinação de compostos vegetais com os antifúngicos comumente utilizados, atuando em sinergismo.

Os flavonóides, entre eles baicaleína e crisina, têm se apresentado como alternativas promissoras na inibição de diversos micro-organismos. Poucos trabalhos têm se dedicado a investigar o potencial antifúngico e sinérgico da baicaleína e da crisina, e os realizados concentram-se principalmente em *C. albicans*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antifúngica dos flavonóides baicaleína e crisina frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, sua interferência na cinética de crescimento, bem como o potencial sinérgico da baicaleína com o fluconazol.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de suscetibilidade de cepas e isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, frente ao antifúngico fluconazol, pelo método de Microdiluição em Caldo;
- Avaliar o potencial antifúngico dos flavonóides baicaleína e crisina sobre cepas e isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos flavonóides baicaleína e crisina sobre as cepas e isolados testados;
- Avaliar a influência destes flavonóides nas etapas da curva de crescimento, nas taxas de inibição e tempo de geração de cepas e isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*;
- Avaliar o potencial sinérgico do flavonóide baicaleína com o fluconazol, nas cepas e isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*;
- Avaliar a ação da combinação sinérgica de baicaleína e fluconazol na morfologia e arranjo celular das cepas e isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, por Microscopia Eletrônica de Varredura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* compreende em torno de 200 espécies, das quais cerca de 20 já foram associadas a processos infecciosos. Leveduras do gênero *Candida* encontram-se geralmente como comensais, sendo detectadas na microbiota humana (revisado por RIBEIRO et al., 2004).

Entretanto, determinados fatores podem levar a alterações do estado fisiológico ou no sistema imune do hospedeiro, como comprometimento de barreiras anatômicas e alteração do sistema imune, e favorecer a mudança do estado comensal destas leveduras para um estado de patogenia, tornando-as capazes de causar um amplo espectro de infecções (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Espécies do gênero *Candida* possuem uma ampla capacidade de responder a mudanças ambientais e no hospedeiro. Assim, vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção por estes micro-organismos (revisado por HAYNES, 2001).

A complexidade das interações entre *Candida* e o hospedeiro sugere que estes fungos possuem ampla versatilidade genética, que permite sua adaptação a diferentes microambientes. Assim, estas leveduras podem colonizar e causar infecções em muitos sítios anatômicos distintos, os quais podem ser amplamente variados quanto ao meio fisiológico (revisado por HAYNES, 2001; CALDERONE; FONZI, 2001; ROMANI et al., 2003). Dentre os sítios anatômicos de infecção por *Candida* estão pele e unhas, mucosas, corrente sanguínea e sistema urinário (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SPOLIDORIO et al., 2003; CROCCO et al., 2004; GALLE; GIANINI, 2004; MUJICA et al., 2004; TUON; NICODEMO, 2006; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; HOLANDA et al., 2007; WINGETER et al., 2007; FRANÇA et al., 2008).

Infecções sistêmicas por *Candida* spp. representam um problema de importância clínica crescente, gerando altos índices de morbidade, longos períodos de internação, alto custo de tratamento, assim como altas taxas de mortalidade (WEY et al., 1988; OLIVEIRA et al., 2001; revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Candida albicans é considerada a espécie mais patogênica para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas que, em doentes imunocomprometidos, podem ser fatais. Embora infecções de mucosa sejam a forma de doença mais comum, as infecções sistêmicas provocadas por esta levedura aumentaram particularmente em doentes com o sistema imunológico comprometido, em particular, doentes infectados com o vírus HIV (ELLEPOLA et al., 1998; CHANDRA et al., 2001).

Candida tropicalis possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal, e tem sido relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias. Em países de América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é uma das mais freqüentes (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida parapsilosis é considerado agente de infecções exógenas por ser capaz de colonizar a pele, principalmente as mãos de profissionais da saúde, assim como as soluções glicosadas de uso hospitalar e catéter venoso central. Sua detecção é particularmente associada à nutrição parenteral total. A ocorrência de *C. parapsilosis* é maior em crianças, principalmente em prematuros internados em unidades de terapia intensiva (revisado por DOUGLAS, 2002; SHIN et al., 2002; revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; FRANÇA; RIBEIRO; TELLES, 2008).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO *CANDIDA*

Espécies de leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Durante as últimas décadas, houve um aumento na incidência de infecções causadas por *Candida* spp. em humanos, especialmente em pacientes com o sistema imunológico comprometido (o caso de pacientes HIV positivos, com desenvolvimento de AIDS, ou pacientes transplantados) (SELITRENNIKOFF, 2001; CHANG et al., 2003; KUHN et al., 2003). Em hospitais terciários, leveduras do gênero *Candida* respondem por cerca de 80% das infecções fúngicas (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Até recentemente, *C. albicans* correspondia a espécie de maior interesse clínico, contudo, paralelamente ao aumento da incidência de candidemias,

observou-se aumento da freqüência dessas infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* como: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* e *C. lusitaniae* (COLOMBO, 2003; revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HINRICHSEN et al., 2008), nos casos de candidúria (OLIVEIRA et al., 2001; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007), bem como em infecções de mucosas e superficiais (ZAHRA et al., 2003; GALLE; GIANINI, 2004; FIGUEIREDO et al., 2007; TAMURA et al., 2007; JAYATILAKE et al., 2009; ROTA, 2009).

As razões para essa inversão no padrão de distribuição das espécies ainda não estão completamente elucidadas, podendo estar fortemente relacionadas ao uso de antibióticos de amplo espectro, agentes antineoplásicos, cateterismo endovenoso e o crescente número de pacientes com neutropenia e imunossupressão (NGUYEN et al., 1996; ABI-SAID et al., 1997; CHENG et al., 2005). Tem sido proposto que o uso profilático de fluconazol seja responsável pela relativa redução de isolamento de *C. albicans* em hemoculturas, em comparação com espécies não-*albicans* (NGUYEN et al., 1996; ABI-SAID et al., 1997). Ainda, o aumento da ocorrência de espécies não-*albicans* pode estar relacionado com o potencial de virulência destes micro-organismos, de modo que estudos demonstraram que espécies não-*albicans* expressaram diferencialmente determinados fatores de virulência avaliados, quando comparadas a isolados de *C. albicans* (TAMURA et al., 2007; FURLANETO-MAIA et al., 2008). Ainda, a aplicação de metodologias mais aprimoradas de identificação molecular tornaram a identificação de espécies mais acurada (NHO et al., 1997; COIGNARD et al., 2004; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

O sítio de colonização pode também determinar a expressão de determinados fatores, favorecendo a colonização por outras espécies que não *C. albicans* (revisado por HAYNES, 2001; FELK et al., 2002; KOGA-ITO et al., 2006). Em estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2001), os dados mostraram que, de 166 isolados de amostras de urina, 53% corresponderam a *C. tropicalis*, e somente 36% de *C. albicans*.

Em estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, os dados mostraram que, das amostras isoladas de sangue de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, 35% corresponderam a *C. tropicalis*, quando comparadas a 25% de *C. albicans*. Neste mesmo estudo, dos

isolados obtidos de micoses superficiais (pele e unha) a espécie prevalente foi *C. parapsilosis* (45%), seguida de *C. tropicalis* (35%) (ROTA, 2009).

Dentre as condições associadas à ocorrência de infecções por espécies de *Candida* estão o uso de antibióticos, presença de cateter venoso central, internamento em unidade de terapia intensiva, uso de corticosteroide, quimioterapia, casos de neutropenia e uso de imunossupressores, dentre outros fatores (ABI-SAID et al., 1997; revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; CHENG et al., 2005; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; FRANÇA et al., 2008; HOLLEY et al., 2009).

A epidemiologia das infecções por *Candida* spp. varia conforme a região demográfica (ABI-SAID et al., 1997; TRICK et al., 2002; PFALLER et al., 2004). Estudos recentes demonstram um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata* principalmente nos EUA (TRICK et al., 2002; revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HAJJEN et al., 2004; PFALLER et al., 2006; HACHEM et al., 2008). Já no Brasil, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm sido as espécies não-*albicans* mais frequentemente isoladas (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; COLOMBO et al., 2006; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2008; ROTA, 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência constituem os mecanismos expressos pelas leveduras que contribuem, além do estado fisiológico do hospedeiro, para o desencadeamento da infecção por estes patógenos. A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, em conjunto, é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos micro-organismos quando submetidos a certas condições (STAIB et al., 2000; revisado por HAYNES, 2001; revisado por NAGLIK et al., 2003; SILVA et al., 2007).

Dentre os principais fatores de virulência expressos por diferentes espécies de *Candida* estão a formação do tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento de formas filamentosas (FELK et al., 2002), a variabilidade fenotípica (*switching*) (revisado por SOLL, 1992; JONES et al., 1994), a aderência à superfície celular (revisado por HAYNES, 2001; BARBIERI et al., 2007), a produção

de enzimas extracelulares, tais como proteases e fosfolipases (HUBE; NAGLIK; 2001; DOSTAL et al., 2003; SILVA et al., 2007; TAMURA et al., 2007; BARROS et al., 2008; RORIG et al., 2009), capacidade de formação de biofilme (revisado por DOUGLAS, 2002; revisado por KUMAMOTO, 2002; GOKCE et al., 2007; HASAN et al., 2009), entre outros. A produção de fator hemolítico têm sido reconhecida como possível atributo de patogenicidade em *Candida* (MANNNS et al., 1994; WATANABE et al., 1999; LUO et al., 2001).

O *switching* fenotípico é um mecanismo que gera variantes fenotípicos em uma população clonal, os quais podem diferir quanto à expressão de determinantes de virulência (revisado por YANG, 2003), podendo proporcionar assim maior flexibilidade e melhor adaptação do organismo às condições hostis do hospedeiro (JONES et al., 1994; ANTONY et al., 2007).

A adesão microbiana aos tecidos hospedeiros constitui o evento inicial na patogênese de doenças infecciosas, e é mediada por macromoléculas denominadas adesinas. Existem evidências de que *C. albicans* pode produzir mais de uma estrutura adesiva, sendo que uma manoproteína está primariamente atribuída a essa função (revisado por HAYNES, 2001; revisado por ALVARES et al., 2007).

Dentre as principais enzimas produzidas por espécies de *Candida*, proteinases e fosfolipases têm especial importância no potencial de virulência destes micro-organismos. As proteinases aspárticas secretadas (SAP) degradam diferentes proteínas humanas nos sítios onde ocorre a lesão, como albumina, hemoglobina e queratina, entre muitas outras, e auxiliam no processo de invasão aos tecidos do hospedeiro (revisado por YANG, 2003). São conhecidos hoje 10 diferentes genes SAP (SAP1-10) em *C. albicans* (revisado por NAGLIK et al., 2003). A produção de fosfolipases está associada a hidrólise de ligações entre os fosfolípídeos, principais componentes de membrana. Deste modo, a produção de fosfolipases também é considerada atributo essencial no processo de invasão do epitélio do hospedeiro (revisado por MOHAN; BALLAL, 2008). Isolados fortemente produtores de fosfolipases e proteinases são considerados como mais virulentos, quando comparados a isolados fracamente produtores (revisado por YANG, 2003).

A produção de fator hemolítico ocorre pela necessidade de obtenção de íons ferro. Este fator hemolítico foi caracterizado como uma manoproteína, componente de parede celular, capaz de provocar lise nos eritrócitos, com liberação

de hemoglobina (MANNS et al., 1994; WATANABE et al., 1997; WATANABE et al., 1999).

Biofilmes são estruturas tridimensionais compostas de células circundadas por uma matriz extracelular, produzidos em resposta à adesão à diversas superfícies, e que exibem diversas características fenotípicas distintas, relacionadas à forma celular e características estruturais (revisado por KUMAMOTO, 2002). A habilidade de formar biofilme tem papel importante na relação parasita-hospedeiro, e no desenvolvimento do processo infeccioso (revisado por DOUGLAS, 2002; GOKCE et al., 2007; HASAN et al., 2009).

3.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

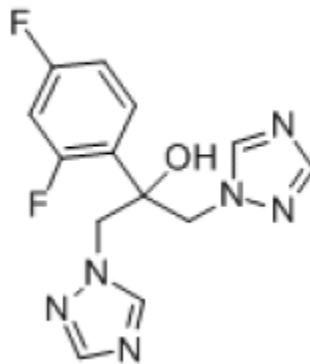
Os agentes antifúngicos empregados no tratamento de infecções fúngicas são classificados de acordo com o mecanismo de ação que exercem sobre as células. Nas classes mais comumente utilizadas encontram-se os polienos (ex. anfotericina B, nistatina); nucleosídeos análogos (pirimidinas-fluorotinas, ex. 5 - fluorocitosina), azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol (Figura 1), itraconazol, voriconazol), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos) (BARCHIESI et al., 1994; ANDRIOLE, 1999; NCCLS, 2002; AHIDJO et al., 2008; revisado por RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Os antifúngicos normalmente utilizados na terapia clínica de tratamento de infecções por *Candida* são os azóis e os polienos. Os azóis inibem a biossíntese do ergosterol, pela inibição da enzima 1,4 α -dimetilase, do citocromo P-450, responsável pela dimetilação do lanosterol. Os polienos formam complexos com o ergosterol e geram canais na membrana plasmática, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana, libertando o conteúdo intracelular, resultando em morte da célula. Assim, os polienos são classificados como fungicidas e têm o espectro de ação mais amplo de todos os antifúngicos disponíveis (revisado por WHITE et al., 1998; ANDRIOLE, 1999; por FILLIPIN; SOUZA, 2006; e por RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Dentre os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos apresentados por *Candida* spp. estão alterações na rota de biossíntese dos esteróis e a expressão aumentada do gene *ERG 11*, envolvido na síntese da enzima

1,4 α -dimetilase. As mutações no gene *ERG 11* resultam em uma afinidade diminuída da 1,4 α -dimetilase ao fluconazol, reduzindo o acúmulo intracelular da droga e a atividade da mesma. Rotas alternativas para a biossíntese e alteração na composição de parede e membrana também são importantes mecanismos. Também observou-se que a superexpressão de genes *CDR 1*, que codificam transportadores da família ABC-ATPase, e *MDR1*, que codificam transportadores facilitadores, contribui para o aumento da expulsão da droga pela célula fúngica. Estes mecanismos de resistência podem ocorrer concomitantemente, aumentando as chances de sobrevivência das células fúngicas quando expostas aos azóis (ALBERTSON et al., 1996; PEREA et al., 2001; revisado por LUPETTI et al., 2002; por MORSCHHAUSER, 2002; GOLDMAN et al., 2004; revisado por ESPINEL-ESPINEL-INGROFF, 2008; MISHRA et al., 2008).

Figura 1 – Fórmula estrutural do Fluconazol.



Fonte: Chemical Book, (2011).

Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência às drogas poliênicas compreendem em alteração na quantidade de esteróis de membrana celular ou na formação de ergosterol e o aumento da atividade da enzima catalase na célula fúngica, impedindo a formação de radicais livres responsáveis pela formação de poros na membrana fúngica (BRAJTBURG et al., 1990; e por FILIPPIN; SOUZA, 2006).

A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos e às defesas naturais do organismo. Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos ainda não estão bem elucidados, mas podem estar inter-relacionados à

sua estrutura, composição da matriz, alterações fenotípicas das células, e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células, como expressão diferenciada de genes da bomba de efluxo, quando comparados à células planctônicas (BAILLIE; DOUGLAS, 1998; revisado por KUMAMOTO, 2002; RAMAGE et al., 2002; DUNNE et al., 2003; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; CAO et al., 2008; SENEVIRATNE et al., 2008; HASAN et al., 2009).

Estudos relacionados ao estabelecimento de técnicas de avaliação da suscetibilidade de diferentes isolados de espécies de *Candida* aos compostos comumente empregados na terapia antifúngica são de fundamental importância na determinação da ocorrência e nível de resistência de *Candida* (PFALLER; BARRY, 1994; PFALLER et al., 1995; REX et al., 1995; SILVA et al., 2002; BI-FAI; GRANT, 2009; LASS-FLÖRL et al., 2010).

A ocorrência de resistência intrínseca, que ocorre quando todos os membros da espécie são resistentes a certos antifúngicos, é observada em *C. krusei* e *C. glabrata* (revisado por RIBEIRO et al., 2004). Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor suscetibilidade ao fluconazol, sendo que 10% dos isolados obtidos de episódios de candidemia apresentaram-se como resistentes a este antifúngico (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Já casos de resistência secundária, ou adquirida, são observadas em resposta à exposição prévia aos antifúngicos, o que tem ocorrido em espécies de *Candida* não-*albicans* normalmente sensíveis (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003), particularmente quanto aos azoles (BARCHIESI et al., 1994; PFALLER; BARRY, 1994; PFALLER et al., 2002; GALLE; GIANINNI, 2004; HAJJEN et al., 2004; YANG et al., 2008). Conforme estudo conduzido por França e colaboradores (2008), os valores de concentração Inibitória mínima (CIM) foram maiores para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, quando comparados à *C. albicans*.

É importante salientar que o antimicrobiano deve possuir toxicidade seletiva, ou seja, inibição do crescimento do micro-organismo sem danos ao hospedeiro. Assim, ele deve atuar com base nas diferenças entre o metabolismo e a estrutura dos micro-organismos e das características correspondentes das células humanas. Embora sejam disponíveis drogas potentes para o tratamento de infecções por leveduras do gênero *Candida*, problemas na toxicidade e desenvolvimento de resistência têm estimulado a pesquisa para a descoberta e

criação de novos fármacos, com alvos de atuação diferentes (BOUCHER et al., 2004; PENDRAK et al., 2004). Uma via alternativa para o controle de candidíases seria a inibição de fatores especificamente relacionados à patogenicidade das leveduras, diminuindo sua virulência e, assim, facilitando o combate destes agentes patogênicos pelo sistema imune do hospedeiro (PERFECT, 1996; STAIB et al., 2008).

3.5 SINERGISMO

Diante do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, há uma grande preocupação relacionada ao controle das infecções provocadas por esses micro-organismos. O emprego de extratos brutos e compostos isolados de plantas tem merecido a atenção de pesquisadores, já que podem inibir o crescimento fúngico por diferentes mecanismos quando comparados aos antimicrobianos alopáticos (TALEB-CONTINI et al., 2003; JUNG et al., 2007; SISTI et al., 2008; HAN et al., 2009; JUDD; MARTIN, 2009).

O interesse no sinergismo surgiu pela busca por compostos capazes de atuarem concomitantemente com os antifúngicos já existentes, de modo que haja utilização de menores concentrações tanto dos antifúngicos quanto dos compostos, sem perda da eficácia do tratamento (SCOTT et al., 1995; MARCHETTI et al., 2000; MARCHETTI et al., 2003; QUAN et al., 2006; NISHI et al., 2009). O uso combinado de diferentes antifúngicos é uma alternativa já comumente utilizada (revisado por JOHNSON et al., 2004; revisado por RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009). Entretanto, estes trabalhos enfatizam possível ocorrência de antagonismo entre diferentes drogas combinadas, e ainda aumento dos efeitos colaterais, o que reduz e até desaconselha a aplicação combinada com certas drogas alopáticas.

Alguns mecanismos propostos para o sinergismo antifúngico compreendem a inibição de diferentes etapas da mesma via biossintética; maior penetração de um dos antifúngicos devido à ação de outro agente na parede ou membrana, inibindo a expulsão de outro; ação simultânea em diferentes alvos na célula fúngica; e ainda diminuição populacional gerada por um, que beneficia a atividade do outro (revisado por JOHNSON et al., 2004).

Conforme revisado por Lass-Florl e colaboradores (2010), as técnicas apropriadas para análises de sinergismo compreendem os métodos de

diluição e análise do tempo de morte. No método clássico de checagem por microdiluição, os parâmetros como meio de cultivo, inóculo e incubação compreendem os já padronizados. O resultado tem por base a utilização de concentrações abaixo das inibitórias e que, quando combinadas, possuem a mesma atividade inibitória quando testadas sozinhas, em concentrações maiores.

Trabalhos reportam a ocorrência de sinergismo de extratos e compostos vegetais com antifúngicos, revelando uma alternativa potencial para controle destes micro-organismos (STEPANOVIC et al., 2003; QUAN et al., 2006; RUKAIADI et al., 2009; AMBER et al., 2010; ENDO et al., 2010; IWASAKI et al., 2010). Por exemplo, alicina, um composto presente no óleo essencial de *Allium sativum*, apresentou atividade sinérgica com fluconazol e cetoconazol, sobre espécies de *Candida* (KHODAVANDI et al., 2010). A atividade sinérgica do alcalóide berberina com fluconazol contra *C. albicans* também tem sido demonstrada. Quan e colaboradores (2006) avaliaram o sinergismo empregando diversas metodologias, sendo estas, difusão em disco, por microdiluição e determinação do tempo de morte celular. Segundo os autores, atividade sinérgica foi observada nas três técnicas avaliadas. Já Iwazaki et al. (2010) demonstraram que além da atividade sinérgica com o fluconazol, a combinação da berberina com o fluconazol, nas concentrações sinérgicas, gerou alterações morfológicas nas células de *C. albicans*, deixando-as colapsadas, com dobras profundas na superfície, além de se apresentarem agrupadas.

3.6 FLAVONÓIDES

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam a formação de compostos, categorizados em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Esse conjunto de compostos é resultado do balanço entre a formação e a eliminação dos mesmos durante o desenvolvimento da planta, sendo este equilíbrio influenciado por fatores genéticos e ambientais, como a luz, temperatura, tipo de solo e disponibilidade hídrica (CARDOSO et al., 2000). A formação destes compostos ocorre como mecanismos de defesa das plantas em resposta a situações diferenciadas, como período prolongados de exposição ao sol, à chuva, ou ainda mecanismos de defesa contra a herbivoria e ataques de patógenos (HILL et al., 1997). De um modo geral, esses compostos, ao serem

incorporados em um organismo animal, podem produzir variados efeitos, alguns dos quais possam vir a ser benéficos (CARDOSO et al., 2000; SANTOS, 2003).

Os terpenos são originados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2004).

Compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas formas simples ou de polímeros. A presença de um número maior de anéis aromáticos e outros radicais confere as características de cada composto fenólico. A ativação da via de produção dos compostos fenólicos está relacionada, entre outras, como parte da resposta em defesa a ataques de micro-organismos fitopatogênicos (NITA-LAZAR et al., 2004; revisado por ANGELO; JORGE, 2007).

Dentre os compostos fenólicos, destaca-se o grupo dos flavonóides, estruturas compostas de 3 anéis aromáticos e diferentes radicais. Dentre os mais comuns destacam-se as classes das flavonas e os flavonóis. Entre outras classes, podem-se citar as isoflavonas, as chalconas e as auronas (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005; revisado por ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonóides têm mostrado expressiva atividade biológica como antitrombocitose, antioxidantes, antimutagênicos e anticarcinogênicos (PETERSON et al., 1998; TURKOGLU et al., 2006; revisado por ANGELO; JORGE, 2007), bem como promissora atividade antimicrobiana (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005; ULANOWSKA et al., 2007). Muitos dos trabalhos na área avaliam o potencial antimicrobiano na forma de extratos de plantas (RAUHA et al., 2000; NAZARUK; JAKONIUK, 2005; KOSALEC et al., 2005; SANGHETHA et al., 2009), entretanto, poucos são os estudos acerca da atividade antifúngica de flavonóides na forma de compostos purificados (TALEB-CONTINI et al., 2003; MERAGELMAN et al., 2005), sendo em sua grande maioria em *C. albicans* (JUNG et al., 2007; CAO et al., 2008; MBAVENG et al., 2008; DAI et al., 2009; HAN, 2009; ORHAN et al., 2009; KANG et al., 2010)

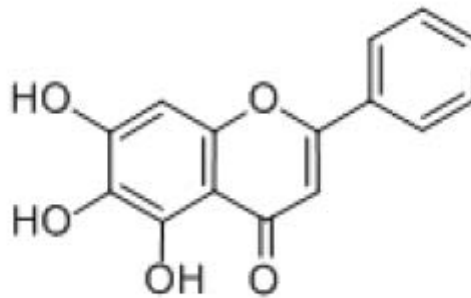
Muitos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana são sugeridos para os compostos fenólicos e em especial aos flavonóides. Os efeitos podem

resultar em formação de complexos com proteínas solúveis e extracelulares e com a parede celular microbiana; prejuízos aos processos enzimáticos envolvidos na produção de energia e síntese de componentes estruturais, enfraquecendo ou destruindo a barreira permeável da membrana celular; alterando o estado fisiológico da célula e também afetando a síntese de ácidos nucleicos (TSUCHIYA et al., 1996; revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005; JUNG et al., 2007).

3.6.1 Baicaleína

Baicaleína é uma flavona, composta de 3 anéis fenólicos, e um oxigênio na posição 4 do anel pirano, e três hidroxilas nas posições 5, 6 e 7, sem radicais no anel benzeno (Figura 2).

Figura 2 – Fórmula estrutural da Baicaleína (5,6,7-trihidroxi-flavona).



Fonte: Chemical Book, (2011).

A baicaleína possui atividade biológica expressiva, como antioxidante e antimicrobiana (SHIEH et al., 2000; YANG et al., 2000; KOO et al., 2002; CUSHNIE; LAMB, 2005; CHANG et al., 2007). Segundo Chou et al. (2009) a baicaleína foi capaz de inibir a proliferação de células de melanoma de carcinoma hepático, sem efeito danoso às células não-tumorais de fígado (CHEN et al., 2009).

Em estudo realizado por Yang e colaboradores (2000) foi avaliada a atividade da baicaleína contra fungos e bactérias, sendo obtido valores de CIM de 70 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores sugerem que a atividade antimicrobiana da baicaleína pode ser atribuída à presença de uma hidroxila como radical na posição 7 da molécula. Este flavonóide mostrou-se também efetivo contra *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 90018, apresentando CI50 (concentração inibitória

capaz de inviabilizar o crescimento de metade da população quando comparado ao controle) de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas espécies (MCNULTY et al. 2009).

Mais recentemente, foi demonstrada que baicaleína também apresenta atividade contra *C. krusei* (KANG et al., 2010). Segundo estes autores, este flavonóide foi responsável pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial, gerando alteração na homeostase mitocondrial. Neste mesmo estudo, *C. albicans* também foi avaliada, com inibição na concentração de $5,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, o tratamento com baicaleína a $10,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ gerou fragmentação do DNA e apoptose em 40% das células de *C. albicans*. Esta fragmentação não foi observada em *C. krusei*. Os autores sugerem a ocorrência de diferentes mecanismos de ação da baicaleína nestas espécies fúngicas.

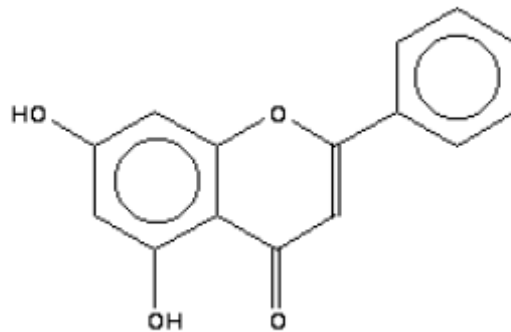
A baicaleína também foi capaz de inibir a formação de biofilme por *C. albicans* (CAO et al., 2008). Segundo estes autores, em presença deste flavonóide, ocorre diminuição na hidrofobicidade superficial celular de *C. albicans* e redução de mais de 70% na formação de biofilme.

Ainda, ocorrência de sinergismo da baicaleína com fluconazol foi avaliada em cepas de *C. albicans* resistentes. Experimentos foram realizados com doses menores que as inibitórias mínimas de ambos baicaleína e fluconazol, e os resultados mostraram que, quando atuantes em conjunto, foram efetivos na inibição do crescimento de *C. albicans*. Os autores sugerem que a baicaleína pode inibir a bomba de efluxo, podendo então diminuir a expulsão da droga e assim, aumentar a suscetibilidade das células aos antifúngicos (HUANG et al., 2008).

3.6.2 Crisina

A crisina (Figura 3) também é uma flavona, composta de 3 anéis fenólicos, e um oxigênio na posição 4 do anel pirano, além de duas hidroxilas nas posições 5 e 7, sem radicais no anel benzeno (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005). Dados da literatura revelam que este flavonóide possui atividade anti-viral (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005), antifúngica (PICMAN et al., 1995; SHIMURA et al., 2007) e antibacteriana (BABU et al., 2006).

Figura 3 – Fórmula estrutural da Crisina (5,7-dihidroxi-flavona).



Fonte: NIST (2011).

Crisina é um dos principais componentes da própolis, uma substância resinosa coletada por abelhas produtoras de mel. Muitos trabalhos reportam a atividade antifúngica da própolis, e em sua maioria atribuem sua atividade antimicrobiana à crisina (POPOVA et al., 2005; SILICI; KUTLUCA, 2005; UZEL et al., 2005; KATIRCIO; MERCAN, 2006; MERCAN et al., 2006; SILICI et al., 2007; CHAILLOU; NAZARENO, 2009), entretanto, até o momento, não foi descrita a atividade antifúngica da substância isolada sobre *Candida* spp.

Moshi e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antifúngica de crisina em associação a uma chalcona, e obtiveram valores de CIM de 31,25 µg.mL⁻¹ contra *C. albicans*, sendo este o primeiro relato para essa combinação.

REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZON, O. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 1122-1128, 1997.
- AHIDJO, B. A.; VEALE, R.; DUSE, A. G.; BECKER, P.; MARAIS, E. The nucleoside reverse transcriptase inhibitors didanosine, lamivudine, stavudine and zidovudine show little effect on the virulence of *Candida albicans* in vitro. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 186-191, 2008.
- ALBERTSON, G. D.; NIIMI, M.; CANNON, R. D.; JENKINSON, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2835-2841, 1996.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3291-3297, 2004.
- ALVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- 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, n. 12, p. 921-925, 2010.
- ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 151-162, 1999.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTONY, G.; SARALAYA, V.; BHAT, G. K.; SHIVANANDA, P. G. Phenotypic switching and its influence on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 241-244, 2007.
- BABU, K. S.; BABU, T. H.; SRINIVAS, P. V.; KISHORE, K. H.; MURTHYB, U. S. N.; RAOA, J. M. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 221-224, 2006.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 1900-1905, 1998.
- BARBIERI, D. S. V.; VICENTE, V. A.; FRAIZ, F. B.; LAVORANTI, O. J.; SVIDZINSKI, T. I. E.; PINHEIRO, R. L. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 38, p. 624-631, 2007.

- BARCHIESI, F.; COLOMBO, A. L.; MCGOUGH, D. A.; RINALDI, M. G. Comparative Study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' Proposed Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2494-2500, 1994.
- BARROS, L. M.; BORIOLO, M. F. G.; ALVES, A. C. B. A.; KLEIN, M. I.; GONÇALVES, R. B.; HOFLING, J. F. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 1172-1278, 2008.
- BI-FAI, P.; GRANT, A. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v. 74, p. 1165-1170, 2009.
- BOUCHER, H. W.; GROLL, A. H.; CHIOU, C. C.; WALSH, T. J. Newer systemic antifungal agents: pharmacokinetics, safety and efficacy. **Drugs**, v. 64, p. 1997-2020, 2004.
- BRAJTBURG, J.; SVETLANA, E.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Inhibition of amphotericin B (Fungizone) toxicity to cells by egg lecithin-glycocholic acid mixed micelles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 12, p. 2415-2416, 1990.
- BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary Hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1-5, 2010.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-335, 2001.
- CAO, Y. Y.; DAÍ, B. D.; WANG, Y.; HUANG, S.; XU, Y. G.; CAO, Y. B.; GAO, P. H., JIANG, Y. Y. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 73-77, 2008.
- CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. Óleos Essenciais. **Boletim Técnico - Série Extensão**, Lavras, v. 8, n. 58, p. 1-42, 2000.
- CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M. A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1422-1427, 2009.
- CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5385-5394, 2001.
- CHANG, H. C.; CHANG, J. J.; HUANG, A. H.; CHANG, T. C. Evaluation of a capacitance method for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 971-976, 2003.

- CHANG, P. C.; LI, H. Y.; TANG, H. J.; LIU, J. W.; WANG, J. J.; CHUANG, Y. C. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, n. 1, p. 56-61, 2007.
- CHEN, C. H.; HUANG, T. S.; WONGC, C. H.; HONG, C. L.; TSAI, Y. H.; LIANG, C. C.; LU, F. J.; CHANG, W. H. Synergistic anti-cancer effect of baicalein and silymarin on human hepatoma HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 638-644, 2009.
- CHENG, M. F.; YANG, Y. L.; YAO, T. J.; LIN, C. Y.; LIU, J. S.; TANG, R. B.; YU, K. W.; FAN, Y. H.; HSIEH, K. S.; HO, M.; LO, H. J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 22, 2005.
- CHOU, D. S.; HSIAO, G.; LAI, Y. A.; TSAI, T. J.; SHEU, J. R. Baicalein induces proliferation inhibition in B16F10 melanoma cells by generating reactive oxygen species via 12-lipoxygenase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 1197-1203, 2009.
- COIGNARD, C.; HURST, S. F.; BENJAMIN, L. E.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Resolution of discrepant results for *Candida* Species identification by using DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 858-861, 2004.
- COLOMBO, A.L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINI, M.L.M.; KUSSANO, E.J.U.; NUCCI, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 41, p. 235-239, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. B. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnosis and Microbiology Infectious Diseases**, v. 34, p. 281-286, 1998.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.

CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Annais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 689-697, 2004.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DAI, B. D.; CAO, Y. Y.; HUANG, S.; XU, Y. G.; GAO, P. H.; WANG, Y.; JIANG, Y. Y. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 803-809, 2009.

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLÍCKOVÁ, L.; SOUCEK, M.; RUMIL, T.; PICHOVÁ, I.; HEIDINGSFELDOVÁ, O. H. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 712-716, 2003.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 139-143, 2002.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2003.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYKE, L. P. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p. 999-1007, 1998.

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

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 101-106, 2008.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, M.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H. C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and immunity**, v. 70, p. 3689-3700, 2002.

FIGUEIREDO, V. T.; SANTOS, D. A.; RESENDE, M. A.; HAMDAN, J. S. Identification and *in vitro* antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v. 164, p. 27-33, 2007.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

- FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; TELLES, F. Q. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, freqüência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 23-28, 2008.
- FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.
- GALLE, L. C.; GIANINI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 229-236, 2004.
- GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p. 265-269, 2007.
- GOLDMAN, G. H.; FERREIRA, M. E. S.; MARQUES, E. R.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; MARTINEZ, P. C. G.; GOLDMAN, M. H. S.; ARNALDO, L.; COLOMBO, A. L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 25-32, 2004.
- HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. **Cancer**, v. 112, p. 2493-99, 2008.
- HAIJEN, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519-1527, 2004.
- HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *C. albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.
- HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B. C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 753-761, 2009.
- HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 591-595, 2001.
- HILI, P.; EVANS, C. S.; VENESS, R. G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 269-275, 1997.

- HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.
- HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 3-9, 2007.
- HOLLEY, A.; DULHUNTY, J.; BLOT, S.; LIPMAN, J.; LOBO, S.; DANCER, C.; RELLO, J.; DIMOPOULOS, G. Temporal trends, risk factors and outcomes in *albicans* and non-*albicans* candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 5541-5547, 2009.
- HUANG, S.; CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; SUN, X. R.; ZHU, Z. Y.; CAO, Y. B.; WANG, Y.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 2234-2236, 2008.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.
- IWAZAKI, R. S.; ENDO, E. H.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, V. C.; GARCIA, L. B.; FILHO, B. P. D. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 201-205, 2010.
- JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 168, p. 165-173, 2009.
- JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; ZEICHNER, L. O.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, p. 693-715, 2004.
- JONES, S.; WHITE, G.; HUNTER, P. R. Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2869-2870, 1994.
- JUDD, W. R.; MARTIN, C. A. Antifungal activity of nontraditional antifungal agents. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p. 86-95, 2009.
- JUNG, H. J.; PARK, K.; LEE, I. S.; KIM, H. S.; YEO, S. H.; WOO, E. R.; LEE, D. G. S-phase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamarascina*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1969-1971, 2007.
- KANG, K.; FONG, W. P.; TSANG, P. W. K. Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. **Mycopathologia**, v. 170, n. 6, p. 391-396, 2010.

KATIRCIO, H.; MERCAN, N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1151-1153, 2006.

KHODAVANDI, A.; ALIZADEH, F.; AALA, F.; SEKAWI, Z.; CHONG, P. P. In vitro investigation of antifungal activity of allicin alone and in combination with azoles against *Candida* species. **Mycopathologia**, v. 169, p. 287-295, 2010.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; VIDOTTO, V.; RESENDE, M. A. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v. 161, p. 219-223, 2006.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1302-1309, 2002.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNE, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharmacologica**, v. 55, p. 423-430, 2005.

KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 506-508, 2003.

KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 608-611, 2002.

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

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2971-2974, 2001.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. 76-81, 2002.

MANNS, J. A.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5154-5156, 1994.

MARCHETTI, O.; MOREILLON, P.; GLAUSER, M. P.; BILLE, J.; SANGLARD, D. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.44, p. 2373-2381, 2000.

MARCHETTI, O.; MOREILLON, P.; ENTENZA, J. M.; VOUILLAMOZ, J.; GLAUSER, M. P.; BILLE, J.; SANGLARD, D. Fungicidal synergism of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans* is not dependent on multidrug efflux transporters encoded by the *CDR1*, *CDR2*, *CaMDR1*, and *FLU1* genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1565-1570, 2003.

MBAVENG, A. T.; NGAMENIB, B.; KUETE, V.; SIMOB, I. K.; AMBASSAB, P.; ROYC, R.; BEZABIH, M.; ETOA, F. X.; NGADJUI, B. T.; ABEGAZ, B. M.; MEYER, M.; LALL, M.; BENGA, V. P. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 483-489, 2008.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; BOLLAREDDY, E.; KESKAR, K.; THORAT, A.; CRANKSHAW, D. J.; HOLLOWAY, A. C.; KHAN, G.; WRIGHT, G. D.; EJIM, L. Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2040-2045, 2009.

MERAGELMAN, T. L.; TUCKER, K. D.; MCCLOUD, T. G.; CARDELLINA, J. H.; SHOEMAKER, R. H. Antifungal flavonoids from *Hildegardia barteri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1790-1792, 2005.

MERCAN, N. Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 56, p. 373-378, 2006.

MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; GUPTA, D. K. Membrane fluidity and lipid composition of fluconazole resistant and susceptible strains of *Candida albicans* isolated from diabetic patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 219-225, 2008.

MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 208-210, 2008.

MORSCHHAUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1587, p. 240-248, 2002.

MOSHI, M. J.; JOSEPH, C. C.; INNOCENT, E.; NKUNYA, M. H. H. *In Vitro* antibacterial and antifungal activities of extracts and compounds from *Uvaria scheffleri*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 269-273, 2004.

MUJICA, M. T.; FINQUELIEVICH, J. L.; JEWUCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 36, p. 107-112, 2004.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400-428, 2003.

NAZARUK, J.; JAKONIUK, P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102 p. 208-212, 2005.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS) **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica**: Norma Aprovada, M27-A2 – Segunda Edição, v. 22, n. 15, 2002.

NGUYEN, M. H.; PEACOCK, J. E. J.; ARTHUR, J.; MORRIS, A. J.; TANNER, D. C.; NGUYEN, M. L.; SNYDMAN, D. R.; WAGENER, M. M.; RINALDI, M. G.; YU, V. L. The changing face of Candidemia: emergence of non- *Candida albicans* species and antifungal resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 100, p. 617-623, 1996.

NHO, S.; ANDERSON, M. J.; MOORE, C. B.; DENNING, D. W. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and *HhaI* digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1036-1039, 1997.

NISHI, I.; SUNADA, A.; ASARI, M. T. S.; IWATANI, Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, p. 1-5, 2009.

NITA-LAZAR, M.; HEYRAUD, A.; GEY, C.; BRACCINI, I.; LIENART, Y. Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, p. 625-634, 2004.

OLIVEIRA, R. D. R.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 231-235, 2001.

ORHAN, D. D.; OZÇELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiology Research**, v. 165, p. 496-504, 2010.

PENDRAK, M. L.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 148-156, 2004.

PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; REBECCA, A.; SANTILLAN, R. A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2676-2684, 2001.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. **Apostila Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p. 1-25, 2004.

PERFECT, J. R. Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1577-1583, 1996.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995-2018, 1998.

PFALLER, M. A.; BARRY, A. L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1992-1996, 1994.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 852-856, 2002.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4419-31, 2004.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 760-763, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; COFFMANN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1094-1097, 1995.

PICMAN, A. K.; SCHNELDER, E. F.; PICMANS, J. Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, p. 683-693, 1995.

POPOVA, M.; SILICI, S.; KAFTANOGLU, O.; BANKOVA, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, v. 12, p. 221-228, 2005.

QUAN, H.; CAO, Y. Y.; XU, Z.; ZHAO, J. X.; GAO, P. H.; QUIN, X. F.; JIANG, Y. Y. Potent in vitro synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1096-1099, 2006.

RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 973-980, 2002.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3-12, 2000.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1-8, 1995.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, p. 106-128, 2004.

- ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 338-343, 2003.
- RORIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 225-227, 2009.
- ROTA, J. F. **Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina**. 2009. 95p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistêmico **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, p. 33-362, 2009.
- RUKAYADI, Y.; LEE, K.; LEE, M.; YONG, D.; HWANG, J. K. Synergistic anticandidal activity of xanthorrhizol in combination with ketoconazole or amphotericin B. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1302-1311, 2009.
- SANGETHA, S.; ZURANI, Z.; SURYANI, S.; SASIDHARAN, S. In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. **Micron**, v. 40, p. 439-443, 2009.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS, Ed. UFSC, 2003. p. 403-434.
- SCOTT, E. M.; TARIQ, V. N.; MCCRORY, R. M. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans* in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2610-2614, 1995.
- SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.
- SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 3259-3266, 2008.
- SHIEH, D. E.; LIU, L. T.; LIN, C. C. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. **Anticancer Research**, v. 20, p. 2861-2865, 2000.
- SHIMURA, H.; MATSUURA, M.; TAKADA, N.; KODA, Y. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 1442-1447, 2007.
- SHIN, J. H.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; KIM, S. H.; SHIN, D. H.; LEE, S. K.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1244-1248, 2002.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SILICI, S.; KOC, A. N.; MISTIK, S. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses **Annals of Microbiology**, v. 57, p. 269-272, 2007.

SILVA, M. R. R.; COSTA, M. R.; MIRANDA, A. T. B.; FERNANDES, O. F. L.; COSTA, C. R.; PAULA, C. R. Evaluation of E-test and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida* sp strains isolated from oral cavities of AIDS patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 121-125, 2002.

SILVA, J. O.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Atividade enzimática, produção de slime e suscetibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 354-355, 2007.

SISTI, M.; SANTI, M.; FRATERNALE, D.; NINFALI, P.; SCOCCIANI, V.; BRANDI, G. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, p. 946-950, 2008.

SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 183-203, 1992.

SPOLIDORIO, L. C.; MARTINS, V. R. G.; NOGUEIRA, R. D.; SPOLIDORIO, D. M. P. Frequência de *Candida* sp. em biópsias de lesões da mucosa bucal. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, p. 89-93, 2003.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 6102-6107, 2000.

STAIB, P.; LERMANN, U.; WARMUTH, J. B.; DEGEL, B.; WÜRZNER, R.; MONOD, M.; SCHIRMEISTER, T.; MORSCHHAUSER, J. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 146-156, 2008.

STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v. 158, p. 353-357, 2003.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; WATANABE, E.; ITO, I. Y.; OLIVEIRA, D. C. R. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 403-408, 2003.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 91-93, 2007.

- TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEN, R. A.; GAYNES, R. P.; Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 35, p. 627-630, 2002.
- TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27-34, 1996.
- TUON, F. F.; NICODEMO, A. C. *Candida albicans* skin abscess. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 301-302, 2006.
- TURKOGLU, A.; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* Murril. **Food Chemistry**, v. 101, p. 267-273, 2006.
- ULANOWSKA, K.; MAJCHRZYK, A.; MOSKOT, M.; JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, J.; WEGRZYN, G. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. **Biologia**, v. 62, p. 132-135, 2007.
- UZEL, A.; SORKUN, K.; ONÇAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.
- WATANABE, T. H.; TANAKA, N.; NAKAO, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 350-353, 1997.
- WATANABE, T.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, T. Characterization of a Haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 689-694, 1999.
- WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F.; WENZEL, R. P. Hospital acquired candidemia: attributable mortality and excess length of stay. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, p. 2642-2645, 1988.
- WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 382-402, 1998.
- WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C. S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 272-276, 2007.
- YANG, D.; HU, H.; HUANG, S.; CHAUMONT, J. P.; MILLET, J. Study on the inhibitory activity, *in vitro*, of baicalein and baicalin against skin fungi and bacteria. **Zhong Yao Cai**, v. 23, p. 272-274, 2000.

YANG, L. Y. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 223-228, 2003.

YANG, Y. L.; WANG, A. H.; WANG, C. W.; CHENG, W. T.; LI, S. Y.; LO, H. J. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan surveillance of antimicrobial resistance of yeasts 2006. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, p. 175-180, 2008.

ZAHRA, L. V.; GATT, P.; BOFFA, M. J.; BORG, E.; MIFSUD, E.; SCERRI, L. Characteristics of superficial mycoses in Malta. **International Journal of Dermatology**, v. 42, p. 265-71, 2003.

PARTE I
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE BAICALEÍNA EM *CANDIDA*
SPP. E SINERGISMO COM FLUCONAZOL

1 INTRODUÇÃO

Leveduras patogênicas do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas como comensais no trato gastrointestinal, mucosas e pele, e podem se tornar patogênicas caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa ou comprometimento de barreiras anatômicas do hospedeiro (revisado por COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

Até recentemente, *Candida albicans* correspondia à espécie de maior frequência clínica, entretanto, têm se observado um aumento na emergência de espécies de *Candida* não-*albicans*, sendo *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* as mais frequentemente isoladas (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

Com o uso profilático de antifúngicos na terapêutica de pacientes internados, bem como com a alta capacidade adaptativa de leveduras do gênero *Candida*, muitos trabalhos têm mostrado um aumento na resistência aos antifúngicos, particularmente quanto aos azoles (revisado por REX et al., 1995, revisado por RUIZ-CAMPS e CUENCA-ESTRELLA, 2009). No Brasil, espécies de *Candida* comumente sensíveis ao fluconazol têm apresentado resistência adquirida, em resposta à prévia exposição aos antifúngicos na terapia clínica (COLOMBO et al., 2003; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; PEREIRA et al., 2010).

Diante da resistência aos antifúngicos apresentada por espécies de *Candida*, há uma preocupação crescente relacionada ao controle das infecções causadas por estas leveduras. A busca de novos antifúngicos se faz necessária, e extratos e compostos vegetais com diferentes alvos de atuação antifúngica têm sido muito estudados (SISTI et al., 2008; HAN et al., 2009; JUDD e MARTIN, 2009).

Nos últimos anos, tem-se observado o interesse em compostos capazes de promover o sinergismo, fenômeno em que um determinado composto pode potencializar a atividade de outro, resultando em redução das concentrações

inibitórias e aumento da efetividade de ambos (revisado por HEMAISWARYA et al., 2008; ENDO et al., 2010; IWAZAKI et al., 2010).

Flavonóides são compostos produzidos por plantas em resposta ao ataque de patógenos (revisado por ANGELO e JORGE, 2007). O flavonóide baicaleína apresenta potencial antifúngico (CAO et al., 2008; DAI et al., 2009; KANG et al.,

2010) e de sinergismo com o fluconazol (HUANG et al., 2008), entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos relacionados ao potencial sinérgico contra *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antifúngico da baicaleína, bem como avaliar a ocorrência de sinergismo com fluconazol sobre estas espécies.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *CANDIDA* SPP

As cepas utilizadas neste estudo pertencem ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina. As cepas *C. albicans* ATCC 64548, *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram gentilmente cedidas pela Dr^a Marcia de Souza Carvalho Melhem, do Instituto Adolfo Lutz. Os isolados de *C. tropicalis* 186.06, *C. tropicalis* 170.06 e *C. parapsilosis* 153.07 foram obtidos de secreção traqueal, urina e urina, respectivamente, de pacientes do Hospital Universitário da UEL (ROTA, 2009). Os isolados foram identificados utilizando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com o uso de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (LI et al., 2003; TAVANTI et al., 2005).

As cepas e isolados foram cultivados em Sabouraud dextrose caldo, a 37°C por 48h. Após, foram esgotados em Sabouraud dextrose ágar, para obtenção de colônias isoladas. As amostras foram então repicadas para Sabouraud dextrose caldo e conservadas a 4°C, como estoque inicial, que foi utilizado durante o experimento.

2.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP. AO FLUCONAZOL

A suscetibilidade foi avaliada segundo normativa do NCCLS, Normativa Aprovada M27-A2 (NCCLS, 2002). O meio utilizado foi o RPMI 1640 (contendo glutamina, sem bicarbonato e sem a adição de Vermelho de Fenol), tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (concentração final de 0,165 mol.L⁻¹) pH 7,0.

As concentrações finais de fluconazol (CAS 86386-73-4, Sigma-Sigma-Aldrich) testadas foram baseadas nas diluições propostas pela normativa do NCCLS, de 0,125 a 64 µg.mL⁻¹. Alíquotas de 100 µL de cada concentração do antifúngico foram adicionadas à microplacas de 96 cavidades estéreis, respeitando ordens de concentração, e armazenadas a 4°C até o momento dos testes.

A partir das soluções-estoque, cada cepa e isolado a serem testados foram cultivados em Sabouraud dextrose caldo, por 24h a 37°C. Após, células dos cultivos foram diluídas em solução salina a 0,85% (p/v), na concentração de 1 a 5×10^6 células.mL⁻¹, confirmada por contagem celular em Câmara de Neubauer. Após, os inóculos foram diluídos na proporção 1:50 (v/v) em RPMI 1640 estéril. Foi então feita uma nova diluição em RPMI 1640, na proporção 1:20 (v/v), resultando em um inóculo de concentração de 1 a 5×10^3 células.mL⁻¹. Aliquotas de 100 µL de cada inóculo foram adicionadas às cavidades contendo as concentrações do antifúngico, já previamente preparadas. A concentração final do inóculo, exposta ao antifúngico, foi de aproximadamente 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹. Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os controles utilizados foram meio RPMI 1640 e meio RPMI 1640 inoculado com cada cepa testada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Asys HiTech UVM 340), a 590 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A determinação da Concentração Inibitória 50 (CI50) foi então determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico dado pela densidade ótica, quando comparado ao controle, sem o antifúngico.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BAICALEÍNA - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A metodologia utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima da baicaleína foi a de Microdiluição em Caldo, proposta pelo NCCLS, Normativa Aprovada M27-A2 (NCCLS, 2002), com adaptações. O meio utilizado foi o RPMI 1640 (contendo glutamina, sem bicarbonato e sem a adição de Vermelho de Fenol), tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (concentração final de 0,165 mol.L⁻¹) pH 7,0, suplementado com 3% (v/v) de Tween 80 (VETEC®) e 1% (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO - VETEC®).

A baicaleína (CAS 491-67-8, Sigma-Aldrich, 98%) foi previamente diluída em DMSO puro, e então foi diluída em meio RPMI 1640 suplementado com 3% de Tween 80, com a concentração final de DMSO de 1%, nas concentrações de 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 20, 2 e 1 µmol.L⁻¹. Aliquotas de 100 µL de meio RPMI 1640 com cada concentração da baicaleína foram adicionadas às microplacas de fundo

chato, estéreis, respeitando as ordens de concentração.

A partir do estoque, cada cepa/isolado a ser testado foram cultivados em Sabouraud dextrose caldo, por 24h a 37°C. Células deste cultivo foram ajustadas em solução salina a 0,85% (p/v), para a concentração de 1 a 5×10^6 células.mL⁻¹, confirmada por contagem celular em Câmara de Neubauer. Foi feita uma diluição 1:50 (v/v), e depois outra diluição 1:20 (v/v), ambas em RPMI 1640 acrescido de 3% de Tween (v/v) e 1% de DMSO (v/v). A partir dessa última diluição, imediatamente foram semeados 100 µL nas placas que já continham as concentrações dobradas do flavonóide. A concentração final dos inóculos foi de aproximadamente 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹. As concentrações finais da baicaleína foram de 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 10, 1 e 0,5 µmol.L⁻¹. Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os controles utilizados foram meio RPMI 1640 acrescido de Tween 80 e DMSO e meio RPMI 1640 acrescido de Tween 80 e DMSO inoculado com cada cepa testada. Cavidades contendo o meio RPMI acrescido de Tween 80 e DMSO e as concentrações dos flavonóides, sem cultivo fúngico, foram realizadas para excluir a possibilidade de contaminação e como branco para a leitura. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Asys HiTech UVM 340), a 590nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A determinação da Concentração Inibitória 50 (CI50) foi então determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico dado pela densidade ótica, quando comparado ao controle, sem o flavonóide.

Ainda, alíquotas dos controles de crescimento sem o flavonóide, do crescimento em presença de baicaleína nas concentrações obtidas de IC50 e do crescimento em presença de baicaleína na máxima concentração testada (1000 µmol.L⁻¹) foram diluídos conforme a turbidez e 50µL foram semeados em placas de Sabouraud dextrose ágar para determinação da diminuição do número de UFC.mL⁻¹, gerada pela baicaleína, nas 24 h de tratamento.

2.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DA BAICALEÍNA NAS DIFERENTES ETAPAS DE CULTIVO

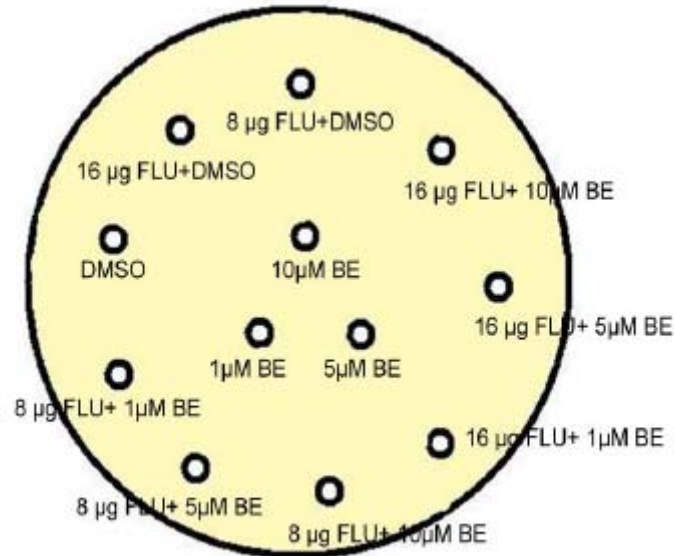
A avaliação da atividade da baicaleína na cinética de crescimento populacional foi avaliada pela obtenção de curvas de crescimento microbiano. Alíquotas de 50 mL de meio RPMI 1640, acrescido de 3% (v/v) de Tween 80 e 1% (v/v) de DMSO, com ausência e presença de baicaleína a 1000 µmol.L⁻¹, foram

inoculadas com 10^4 células.mL⁻¹ de cada cepa e isolado testados, e incubados a 37°C e 180 rpm. Alíquotas foram retiradas a cada duas horas até 24 h e em 48 h. Para a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC.mL⁻¹), foram feitas diluições conforme o tempo de cultivo, e 50 µL foram semeados em placas de Sabouraud dextrose ágar. As placas foram incubadas por 48h a 37°C, e então foi realizada a contagem do número de UFC.mL⁻¹. Ainda, a concentração celular foi determinada em espectrofotômetro, a 590 nm. Também foram realizadas análises dos tempos de geração nas diferentes curvas de crescimento.

2.5 AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE SINERGISMO ENTRE BAICALEÍNA E FLUCONAZOL

A avaliação do potencial sinérgico entre a baicaleína e o fluconazol foi realizada em meio solidificado (ensaio em placa) e em meio líquido. Para a avaliação do sinergismo, foram utilizados *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* 170.06 e *C. parapsilosis* 153.07. A atividade em placa foi realizada segundo Quan e colaboradores (2006), com modificações. Placas contendo Sabouraud dextrose ágar foram semeadas com 10^6 células.mL⁻¹ de cada cepa/isolado testados. Após, discos de papel filtro esterelizados foram colocados eqüidistantes sobre a superfície do ágar previamente semeado. Sobre os discos foram colocados 16 µg e 8 µg de fluconazol por disco. Para cada concentração do antifúngico, foram combinadas as concentrações de 10, 5 e 1 µmol.L⁻¹ de baicaleína por disco, conforme ilustrado na Figura 1. Controles foram feitos com as concentrações de fluconazol adicionadas de DMSO, solvente utilizado na diluição da baicaleína, e da baicaleína acrescida de água ultra pura estéril, solvente do fluconazol. As placas foram então incubadas por 48 h a 37°C, e os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm).

Figura 1 – Representação esquemática do teste de sinergismo em meio solidificado. BE-baicaleína, FLU-fluconazol.



A atividade sinérgica em meio líquido foi realizada conforme descrito no item 2.3. O meio utilizado foi o RPMI 1640, acrescido de 3% (v/v) de Tween 80 e 1% (v/v) de DMSO. As concentrações testadas foram: fluconazol (16, 8, 4, 2,1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 e 0,031 µg.mL⁻¹) e baicaleína (1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 10 e 1 e 0,5 µmol.L⁻¹), combinadas entre si. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C e lidas a 590 nm.

Os valores de IC₅₀ para o fluconazol foram avaliados em ausência e presença de baicaleína, e a ocorrência de sinergismo foi avaliada pelo índice FIC (*Fractional Inhibitory Concentration Index*), de acordo com Odds (2003).

2.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA MORFOLOGIA E ARRANJO CELULAR DE *CANDIDA* SPP TRATADAS COM BAICALEÍNA, FLUCONAZOL E BAICALEÍNA + FLUCONAZOL

A avaliação da morfologia e arranjo celular de *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* 170.06 e *C. parapsilosis* 153.07 foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As concentrações dos compostos utilizados foram as correspondentes aos valores de IC₅₀ para fluconazol e para baicaleína e as combinações sinérgicas entre estes dois compostos, conforme Tabela 4. Células obtidas do cultivo de 24 h, nas condições acima, foram aderidas em lamínula

revestida de Poli-L-lisina e fixadas com solução de glutaraldeído 4% (v/v) em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, a 4°C, por 18 h. Após a fixação, as células foram submetidas a lavagens em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹. Em seguida, as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (p/v) em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, por 1 h na ausência de luz. Após, as células foram lavadas novamente em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, e submetidas a uma série de lavagens alcoólicas em concentrações crescentes de etanol 70%, 80%, 90% e 100%. Após a desidratação alcoólica, as células foram secas ao ponto crítico (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC), recobertas com uma camada de ouro (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados pelo Teste Tukey, com o auxílio do programa Sisvar (versão 5.3), e valores de $P < 0,01$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP. AO FLUCONAZOL

Para a avaliação do perfil de suscetibilidade de *Candida* spp ao fluconazol foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, como descrito no item 2.2.

Como observado na Tabela 1 houve variação quanto à suscetibilidade das diferentes cepas/isolados testados. Os menores valores de CIM 50 (variação de 0,25 a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram observados para *C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* 186.06, *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Para *C. albicans* ATCC 64550 e *C. parapsilosis* 153.07, os valores de CIM 50 variaram de 8 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Com base nas diretrizes do NCCLS (2002) para interpretação de CIM 50 para o fluconazol (sensível, CIM 50 $\leq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$; sensível dose-dependente, CIM 50 de 16-32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; resistente, CIM $\geq 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$), somente *C. albicans* ATCC 64550 e *C. parapsilosis* 153.07 foram sensíveis dose-dependentes, sendo os demais cepas/isolados testados considerados sensíveis.

Tabela 1 – Valores de CIM 50 de fluconazol para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Cepas/isolados	CIM 50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	0,25
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	16
<i>C. tropicalis</i> 186.06	0,5 – 1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	0,5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5 – 1
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	8 – 16

A cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 é utilizada pelo NCCLS (2002) como controle de qualidade para os testes de microdiluição em caldo, sendo a faixa estabelecida de concentração de fluconazol de 0,5 e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste experimento, os valores obtidos (0,5 a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) estão dentro da faixa preconizada

pelo documento normativo. Além disso, os dados obtidos para as cepas *C. albicans* ATCC 64548 e *C. albicans* ATCC 64550 são concordantes com os previamente descritos por Uzun e colaboradores (2000).

3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BAICALEÍNA

3.2.1 Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima de baicaleína contra cepas/isolados de *Candida* sp foi empregada a técnica de microdiluição em caldo como descrito no item 2.3.

As concentrações de baicaleína utilizadas foram de 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 10, 1 e 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, que correspondem a 260, 208, 156, 104, 52, 26, 13, 2,6, 0,26 e 0,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A determinação da CIM 50 foi considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% ou mais do crescimento fúngico quando comparado ao controle (ausência do flavonóide). Os valores de CIM 50 para as amostras testadas estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de CIM 50 de baicaleína para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Cepas/isolados	IC50 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	50
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	100
<i>C. tropicalis</i> 186.06	400
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	200
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	50
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	50

Os dados da Tabela 2 mostram que houve variação quanto aos valores de CIM 50 para as diferentes cepas/isolados testados. As cepas de *C. tropicalis* (isolado 186.06 e ATCC 200956) foram menos sensíveis à inibição pela baicaleína, apresentando valores de IC50 de 400 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. A baicaleína foi mais efetiva na inibição de ambas *C. parapsilosis* testadas (ATCC

22019 e isolado 153.07) e para *C. albicans* ATCC 64548, que foram inibidas à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A cepa *C. albicans* ATCC 64550, sensível dose-dependente para o fluconazol, foi menos sensível à baicaleína, quando comparado à *C. albicans* ATCC 64548, cepa sensível ao fluconazol. Estes dados podem sugerir que a baicaleína apresenta diferentes mecanismos de ação sobre as células de *C. albicans*, quando comparados ao mecanismo de ação do fluconazol. Não houve diferença entre as concentrações inibitórias de baicaleína para *C. parapsilosis* isolado 153.07 (sensível dose-dependente ao fluconazol) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (sensível ao fluconazol), sendo ambas inibidas a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Embora não hajam diferenças no perfil de suscetibilidade ao fluconazol entre as amostras de *C. tropicalis* testadas, foi possível observar que a amostra isolada de secreção traqueal foi mais resistente à baicaleína, quando comparada à cepa de coleção (ATCC 200956). Já entre o isolado de urina de *C. parapsilosis* (153.07) e a cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019, não houveram diferenças na inibição.

McNulty e colaboradores (2009) avaliaram a inibição de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 90018 pela baicaleína, e encontraram valores de IC 50 de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas espécies. No presente trabalho, as duas cepas de *C. albicans* testadas tiveram valores de CIM 50 entre 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (13 e 26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Já ambas *C. parapsilosis* apresentaram CIM 50 de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes dados demonstram que diferentes isolados e cepas de uma mesma espécie apresentam diferenças na suscetibilidade à baicaleína. Este fato pode explicar a diferença encontrada entre este trabalho e o de McNulty e colaboradores (2009). Ainda, segundo estes autores, a baicaleína inibiu a atividade do citocromo P450. Os autores sugerem que este fato se mostra como evidência circunstancial que a atividade antifúngica deste composto pode estar associada à inibição deste citocromo, por exemplo, na via do ergosterol.

A técnica de microdiluição em caldo, empregada neste trabalho, tem sido a mais utilizada nas determinações de atividade antifúngica de extratos e compostos vegetais, por ser rápida e de fácil execução (SCORZONI et al., 2007). A técnica prevê o emprego de corante vermelho de fenol adicionado ao meio RPMI, entretanto, no presente trabalho, optamos por não utilizá-lo pois o crescimento microbiano gera mudança de coloração ao meio, e ainda o flavonóide apresenta

uma coloração característica, com interferência na leitura espectrofotométrica. Cabe ressaltar que os solventes utilizados para a dissolução dos flavonóides, Tween 80 e DMSO, não interferiram no crescimento das cepas/isolados testados.

Neste trabalho também foi avaliada a redução no número de UFC.mL⁻¹ após crescimento em presença de baicaleína (concentrações de CIM 50 e 1000 µmol.L⁻¹), comparado ao do controle (ausência de baicaleína). Os valores de UFC.mL⁻¹ para as concentrações testadas, bem como a queda em log de ambas as concentrações quando comparadas ao controle estão apresentados na Tabela 3 e Figura 2.

Houve variação quanto a redução de UFC para as diferentes cepas/isolados testados. Nas concentrações de CIM 50 houve queda de 1 escala logarítmica (log10) para *C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* ATCC 200956 e para ambas *C. parapsilosis* testadas (153.07 e ATCC 22019). Para *C. albicans* ATCC 64550 e *C. tropicalis* 186.06 não houve queda em escala log.

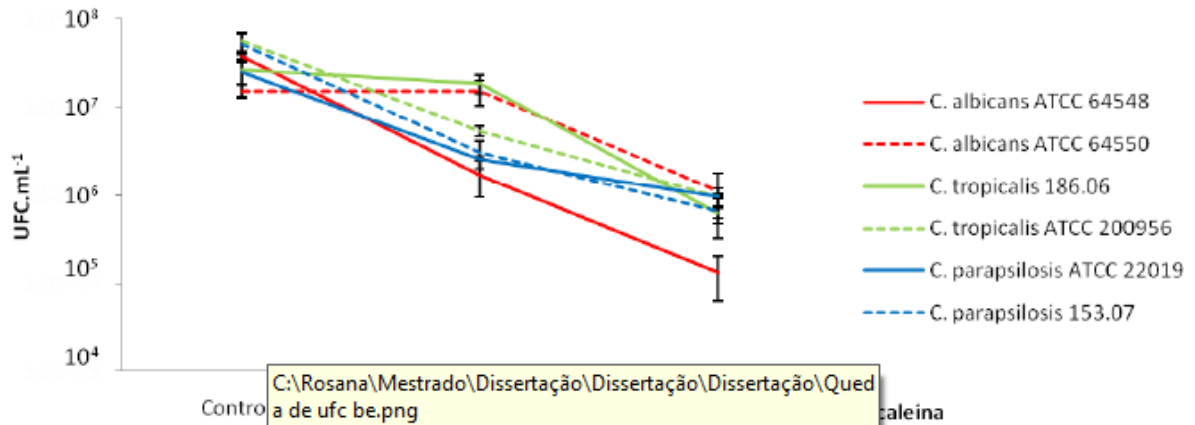
Já na concentração máxima testada de baicaleína (1000 µmol.L⁻¹), a maior queda na viabilidade celular foi observada em *C. albicans* ATCC 64548 (queda de 2 log). Todas as outras cepas/isolados testados tiveram queda de 1 log no número de UFC.mL⁻¹.

Tabela 3 – Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹) após incubação de 24 h na ausência e presença de baicaleína (concentrações obtidas para o IC 50 e 1000 µmol.L⁻¹) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Cepas/isolados	Valores de UFC.mL ⁻¹					
	Controle	IC50*	Redução de UFC.mL ⁻¹		UFC.mL ⁻¹ 1000 µmol.L ⁻¹	Redução de UFC.mL ⁻¹ (log 10)
			UFC.mL ⁻¹ IC50	UFC.mL ⁻¹ (log 10)		
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	1,1 x 10 ⁷	50	5,0 x 10 ⁵	1	4,0 x 10 ⁴	2
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	4,5 x 10 ⁶	100	4,4 x 10 ⁶	0	3,3 x 10 ⁵	1
<i>C. tropicalis</i> 186.06	1,7 x 10 ⁷	400	5,5 x 10 ⁶	0	4,7 x 10 ⁵	1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	1,7 x 10 ⁷	200	1,5 x 10 ⁶	1	2,9 x 10 ⁵	1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	7,4 x 10 ⁶	50	7,7 x 10 ⁵	1	2,9 x 10 ⁵	1
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	1,5 x 10 ⁷	50	9,0 x 10 ⁵	1	1,9 x 10 ⁵	1

* µmol.L⁻¹

Figura 2 – Redução de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) após incubação na ausência e presença de baicaleína (concentrações obtidas para o IC 50 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.



Neste trabalho foram observados diferentes níveis de inibição entre as espécies testadas, e entre cepas de uma mesma espécie, tanto ao nível do crescimento quanto da viabilidade celular após o tratamento com a baicaleína.

A cepa *C. albicans* ATCC 64548 foi inibida em presença de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de baicaleína e teve a maior redução de viabilidade celular observada (2 log no número de UFC.mL⁻¹), sendo a mais sensível dentre as testadas. Já o isolado *C. tropicalis* 186.06 foi inibido a 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e teve a viabilidade celular reduzida em 1 log, sendo o isolado menos sensível, nas condições testadas.

Com base nestes dados, é possível sugerir que a baicaleína atua de forma diferenciada nas diferentes espécies testadas e que essa diferença também ocorre entre diferentes cepas ou isolados de uma mesma espécie.

Kang e colaboradores (2010) avaliaram o potencial antifúngico de baicaleína sobre *C. albicans* e *C. krusei*, e encontraram valores de CIM 80 de 5,4 e 2,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Segundo os autores, a baicaleína gerou uma despolarização do potencial de membrana mitocondrial em ambas espécies. Ainda, este flavonóide gerou aumento no nível de espécies reativas de oxigênio e também fragmentação do DNA em *C. albicans*, mas não em *C. krusei*. Os autores sugerem mecanismos diferentes de ação da baicaleína nas duas espécies.

Dai e colaboradores (2009) demonstraram que a baicaleína foi capaz de induzir a apoptose em *C. albicans*, com aumento da expressão de três genes

envolvidos no processo apoptótico, bem como alteração no potencial de membrana mitocondrial, reduzindo sua função. Ainda, neste trabalho foi observada expressiva condensação da cromatina dentro do envelope nuclear desta levedura.

3.2.2 Avaliação da Ação da Baicaleína nas Diferentes Fases da Curva de Crescimento

A ação da baicaleína nas diferentes fases do crescimento populacional foi avaliada pela obtenção de curvas de crescimento na ausência e presença do flavonóide ($1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Os dados estão apresentados nas Figuras 3, 4 e 5.

Os dados revelam que em presença de baicaleína houve prolongamento da fase lag para as três espécies testadas. O início da fase log ocorreu posteriormente (entre 6 e 10 h) ao do cultivo controle (ausência de baicaleína). Em cultivo com baicaleína a fase estacionária não foi observada no período de incubação testado (48h) em nenhuma das cepas/isolados testados (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas de *C. albicans* na ausência (controle) e presença de baicaleína.

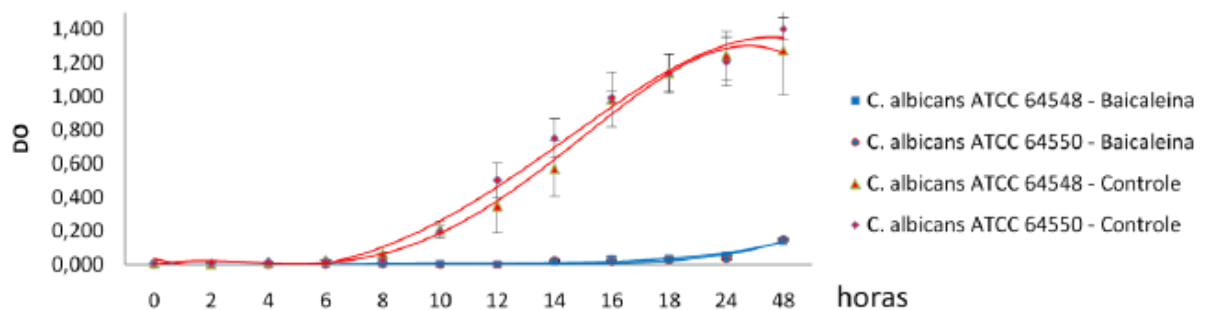


Figura 4 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de baicaleína.

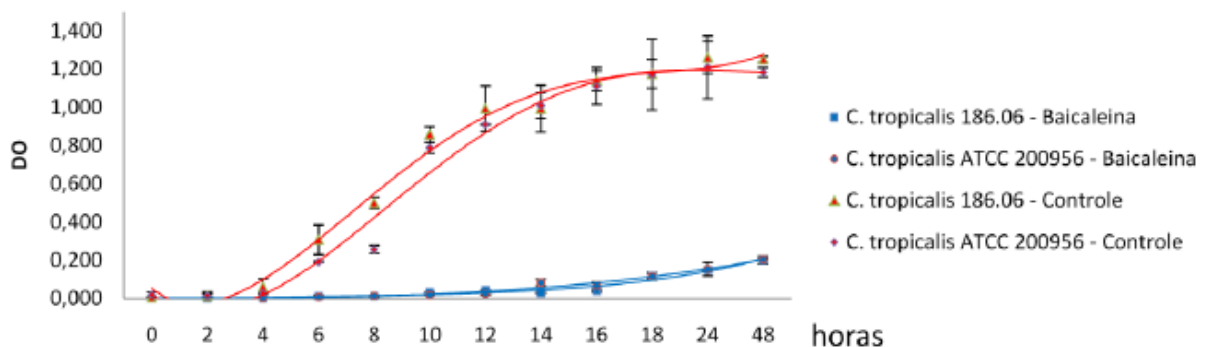
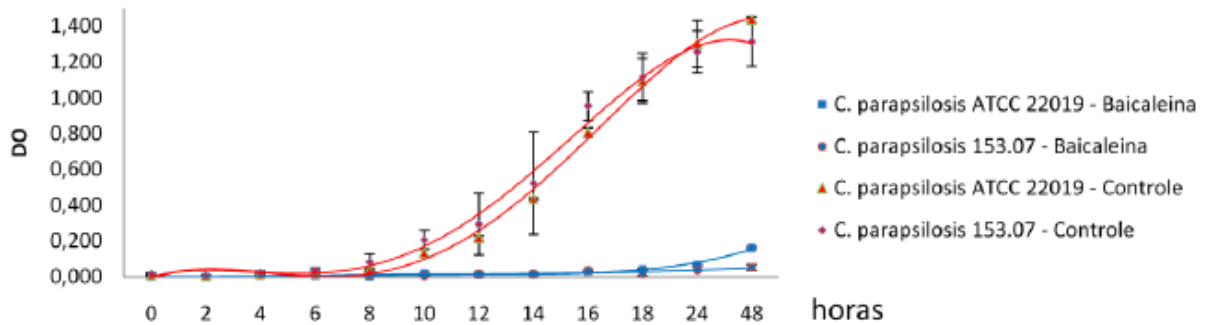


Figura 5 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. parapsilosis* na ausência (controle) e presença de baicaleína.



Durante as curvas de crescimento foram realizadas contagens de UFC.mL⁻¹. Nas primeiras 4 h de cultivo foi observada redução no número de UFC.mL⁻¹ apenas no cultivo de *C. albicans* ATCC 64550 em presença de baicaleína. Para as demais cepas/isolados testados os valores de UFC.mL⁻¹ apresentaram crescimento estável (dados não mostrados).

Estes dados reforçam a idéia de que é possível que haja mais de um mecanismo de ação da baicaleína sobre *Candida* spp nas condições testadas. Para *C. albicans* ATCC 64550 foi observada ocorrência de inviabilidade celular de uma parte da população nas primeiras horas do cultivo. Considerando a ocorrência de morte celular na fase inicial de crescimento, não necessariamente haveria atraso na fase log, pois as células sobreviventes cresceriam normalmente, aumentando em escala geométrica o número celular. O prolongamento da fase lag então, sugere a necessidade de um tempo maior de adaptação das leveduras ao meio contendo baicaleína. Já para *C. albicans* ATCC 64548 e para as outras espécies testadas, não houve morte celular nas primeiras 4h de cultivo.

A Tabela 4 mostra os tempos de geração após cultivo em ausência (controle) e presença de baicaleína. Nos cultivos com baicaleína houve aumento nos tempos de geração para todas as três espécies testadas.

Tabela 4 – Tempos de geração de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* após cultivo em ausência (controle) e presença de baicaleína.

Cepas/isolados	Tempo de Geração (min)	
	Controle*	Baicaleína
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	105 ^a	473 ^c
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	121 ^a	182 ^a
<i>C. tropicalis</i> 186.06	136 ^a	191 ^a
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	122 ^a	374 ^{bc}
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	112 ^a	336 ^b
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	111 ^a	773 ^d

*Letras diferentes indicam diferenças estatísticas quando comparados pelo teste Tukey (P<0,01).

Os maiores aumentos nos tempos de geração, após cultivo em presença de baicaleína, foram observados para o isolado *C. parapsilosis* 153.07, seguido de *C. albicans* ATCC 64548, que apresentaram valores de CIM 50 de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Estes dados mostram que as cepas mais sensíveis à baicaleína necessitaram de tempos maiores de geração para duplicação da população. Já *C. albicans* ATCC 64550 e *C. tropicalis* 186.06, inibidos sob concentrações de 100 e 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, não apresentaram diferença significativa com os controles, mostrando que, além de serem mais resistentes, mantiveram as mesmas taxas de crescimento, quando comparados aos controles (ausência de baicaleína).

Estes dados permitiram observar que houve diferenças significativas nos tempos de geração entre diferentes espécies, e diferentes isolados/cepas de cada espécie. No entanto, não é possível fazer comparações diretas entre estes dados e o da curva de crescimento, pois foram utilizados inóculos iniciais distintos nas duas análises. Ainda, foram utilizadas diferentes concentrações de Tween 80 e DMSO em ambos os experimentos.

3.3 SINERGISMO COM FLUCONAZOL

Para a avaliação do sinergismo da baicaleína com o fluconazol foram utilizadas *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* 170.06 e *C. parapsilosis* 153.07. Os ensaios foram realizados em meio solidificado (placa) e em meio líquido,

empregando-se diferentes concentrações de fluconazol e baicaleína conforme descrito no item 2.6. No ensaio em placa não foi observado sinergismo entre baicaleína e fluconazol, nas condições testadas (Figura 6), para nenhuma das espécies testadas.

Figura 6 – Análise de sinergismo em meio solidificado, entre fluconazol e baicaleína, para *C. parapsilosis* 153.07.



Segundo Nascimento et al. (2007) os métodos de diluição em meio líquido e em meio sólidos são baseados na dispersão homogênea da amostra em meio de cultura seletivo ao agente testado. Estes métodos são mais indicados para amostras que são solúveis em água ou lipofílicas e para obtenção da CIM desses compostos. A diluição em meio líquido é considerada a técnica mais precisa, recomendada para a determinação da CIM de amostras puras. A diversidade de critérios e técnicas empregadas nos estudos de atividade antimicrobiana de compostos vegetais (plantas medicinais), bem como as características de algumas amostras apresentarem propriedades lipofílicas, tem suscitado outras considerações (RIOS et al., 1988). Os métodos empregados para a análise da atividade antimicrobiana são classificados em três grupos: difusão, diluição (em meio líquido ou em meio sólido) e o método bioautográfico. Dentre estes, a técnica de microdiluição em caldo possui a vantagem, sobre os demais métodos, de fornecer resultados quantitativos (LAMBERT et al., 2001).

Neste trabalho, o teste de sinergismo entre baicaleína e fluconazol foi também realizado pela técnica de microdiluição em caldo. A Tabela 5 mostra os dados de suscetibilidade das três espécies testadas. Os menores valores de CIM para o fluconazol e baicaleína foram observados para o isolado 170.06 de *C. tropicalis* (8 µg.mL⁻¹ e 10 µmol.L⁻¹, respectivamente). *C. albicans* ATCC 64550 e *C. parapsilosis* 153.07 apresentaram o mesmo valor de CIM para o fluconazol (16 µg.mL⁻¹), embora tenham diferido quanto a suscetibilidade à baicaleína.

Tabela 5 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol, baicaleína e fluconazol+baicaleína para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Espécies	CIM 50			Índice FIC
	Fluconazol (µg.mL ⁻¹)	BAICALEÍNA (µmol.L ⁻¹)	FLU + BE	
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	16 ^a	100 ^c	0,5 ^f / 50 ^e	0,531
<i>C. tropicalis</i> 170.06	8 ^b	10 ^d	4 ^g / 0,5 ⁱ	0,550
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	16 ^a	50 ^e	0,125 ^h / 10 ^d	0,207

*Letras diferentes indicam diferenças estatísticas quando comparados pelo teste Tukey (P<0,01).

FLU – fluconazol

BE – baicaleína

FIC – (*Fractional Inhibitory Concentration*), segundo equação 1:

$$FIC = \frac{CIM\ A\ Combinada}{CIM\ A\ Isolada} + \frac{CIM\ B\ Combinada}{CIM\ B\ Isolada} \quad (1)$$

O uso combinado de fluconazol e baicaleína resultou em redução nos valores de CIM para ambas substâncias (Tabela 4). Nota-se ainda que o nível de redução foi variável entre as espécies analisadas. Quanto ao fluconazol, a maior redução foi observada para *C. parapsilosis* 153.07, com redução de 128 vezes (16 µg.mL⁻¹ para 0,125 µg.mL⁻¹), seguido de *C. albicans* ATCC 64550, com redução de 16 µg.mL⁻¹ para 0,5 µg.mL⁻¹. Já quanto a baicaleína, a maior redução foi observada para *C. tropicalis* 170.06, com redução de 20 vezes (10 µmol.L⁻¹ para 0,5 µmol.L⁻¹).

Segundo o cálculo para determinação do índice FIC, para a ocorrência de sinergismo é necessário que haja atividade inibitória em concentrações no mínimo quatro vezes inferiores de ambos compostos (BONAPACE et al., 2002). Segundo Odds (2003), valores de FIC <0,5 indicam ocorrência de

sinergismo entre os compostos analisados; FIC >0,5 e <4 são considerados como indiferença na atuação dos compostos, e FIC >4 é considerada a ocorrência de antagonismo entre os compostos analisados.

Como observado na Tabela 4, a ocorrência de sinergismo entre fluconazol e baicaleína ocorreu somente para *C. parapsilosis* 153.07, que apresentou índice FIC de 0,207. Este trabalho relata a primeira ocorrência de sinergismo entre estes compostos na inibição de *C. parapsilosis*.

Entretanto, *C. albicans* ATCC 64550 e *C. tropicalis* 170.06 apresentaram índices FIC de 0,531 e 0,550 respectivamente. Apesar de estarem dentro da faixa caracterizada como indiferença segundo Odds (2003), houve uma queda bastante expressiva nos valores de CIM de fluconazol para *C. albicans* ATCC 64550 e também houve queda expressiva na CIM de baicaleína para *C. tropicalis* 170.06. Esses dados mostram que, mesmo não apresentando atividade sinérgica, a baicaleína é capaz de atuar potencializando a inibição do crescimento fúngico pelo fluconazol.

Huang e colaboradores (2008) avaliaram o sinergismo entre baicaleína e fluconazol na inibição de isolados de *C. albicans* resistentes a este antifúngico. Os dados mostraram que, combinados, os valores de CIM 50 diminuíram em 64 vezes, para fluconazol e baicaleína. Os dados não corroboram com os encontrados neste experimento para *C. albicans*. Neste trabalho, a baicaleína apresentou CIM 50 de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e queda para 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para *C. albicans* ATCC 64550, não apresentando sinergismo. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que, no trabalho de Huang e colaboradores (2008), foram utilizados isolados clínicos, e neste, foi utilizada uma cepa de referência. Diferentes isolados respondem de maneira diferenciada à baicaleína, como nos dados já mostrados neste mesmo experimento. Segundo estes autores, a baicaleína foi capaz de inibir a bomba de efluxo, reduzindo a expulsão da droga e, por conseguinte, aumentando a suscetibilidade das células ao antifúngico. Os autores ainda sugerem que este não seja o único mecanismo de atuação da baicaleína no sinergismo com fluconazol sobre *C. albicans*, de modo que a baicaleína possa atuar em outros fatores relacionados à resistência.

Endo e colaboradores (2010) avaliaram o sinergismo de compostos presentes na casca de romã com o fluconazol na inibição de *C. albicans*. Os autores sugerem que o tratamento com o fluconazol seja capaz de reduzir significativamente

os níveis de ergosterol dentro da célula, resultando em uma perturbação na membrana celular. Esta perturbação pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana plasmática, facilitando a penetração da punicalangina no interior da célula.

Diversos modos de ação são reportados para explicar o sinergismo entre diversos compostos vegetais e antimicrobianos, como a inibição de diferentes etapas da mesma via biossintética; maior penetração de um dos antifúngicos devido à ação de outro agente na parede ou membrana, inibindo a expulsão de outro; ação simultânea em diferentes alvos na célula fúngica; modificação de sítios ativos de atuação; modificação da droga; e ainda diminuição populacional gerada por um, que beneficia a atividade do outro (revisado por HEMAISWARYA et al., 2008).

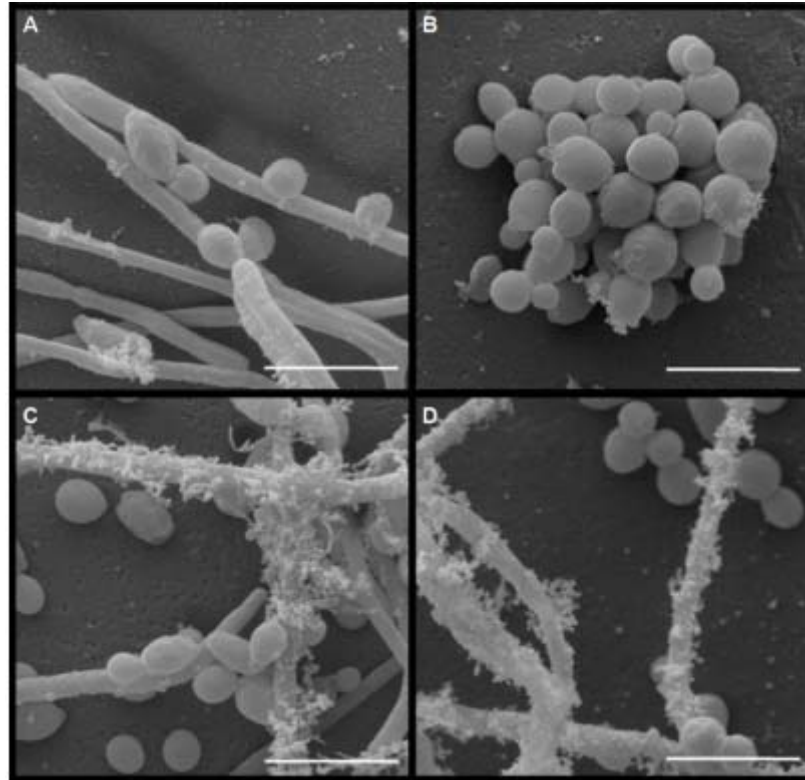
Até o momento, ainda são poucos os trabalhos que reportam o potencial antimicrobiano e sinérgico de baicaleína com agentes antibacterianos e antifúngicos (KOO et al., 2002; CHANG et al., 2007; CAO et al., 2008; HUANG et al., 2008; DAI et al., 2009; MCNULTY et al., 2009; KANG et al., 2010).

3.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA MORFOLOGIA E ARRANJO CELULAR DE *CANDIDA* SPP SUBMETIDAS À BAICALEÍNA, FLUCONAZOL E BAICALEÍNA + FLUCONAZOL

No presente trabalho foi avaliado possíveis alterações morfológicas e no arranjo celular das três espécies de *Candida* quando submetidas ao fluconazol, baicaleína e fluconazol + baicaleína, usando Microscopia Eletrônica de Varredura, conforme item 2.6.

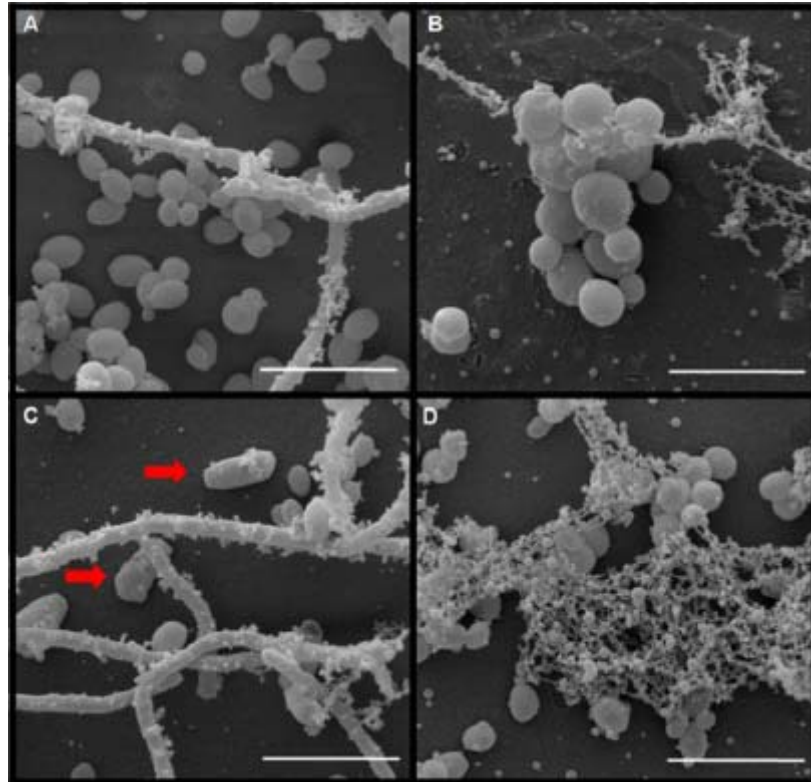
A análise ultraestrutural revelou que as espécies testadas apresentaram diferenças na organização celular frente à presença de baicaleína, fluconazol e à combinação sinérgica entre estes compostos (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 7 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de células de *C. albicans* ATCC 64550, cultivadas em RPMI (A), em presença de fluconazol (B), em presença de baicaleína (C), e em presença de fluconazol + baicaleína (D). Aumento de 6000 vezes. Barra 10 μ m.



Como observado na Figura 7, o cultivo de *C. albicans*, em RPMI, foi caracterizado pela presença de blastoconídeos e células diferenciadas em hifas, além da ocorrência de material extracelular. No cultivo em presença de fluconazol ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) as células mantiveram-se no formato de blastoconídeos, com arranjo agrupado, e presença de material extracelular. Já no tratamento com baicaleína ($100 \mu\text{mol}^{-1}$), as células apresentaram-se como hifas e blastoconídeos, semelhante ao observado no meio RPMI (controle). Nesta condição de cultivo, a quantidade de material extracelular foi visivelmente superior quando comparado ao crescimento em RPMI e em presença de fluconazol. No cultivo em presença de fluconazol e baicaleína ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol}^{-1}$, respectivamente) as células também apresentaram-se como hifas e blastoconídeos, e presença de material extracelular em quantidades superiores ao observado nas demais condições de cultivo. É importante destacar que a presença de material extracelular está preferencialmente associada às hifas.

Figura 8 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de células de *C. tropicalis* 170.06, cultivadas em RPMI (A), em presença de fluconazol (B), em presença de baicaleína (C), e em presença de fluconazol + baicaleína (D). Aumento de 6000 vezes. Setas indicam células alongadas. Barra 10 μ m.

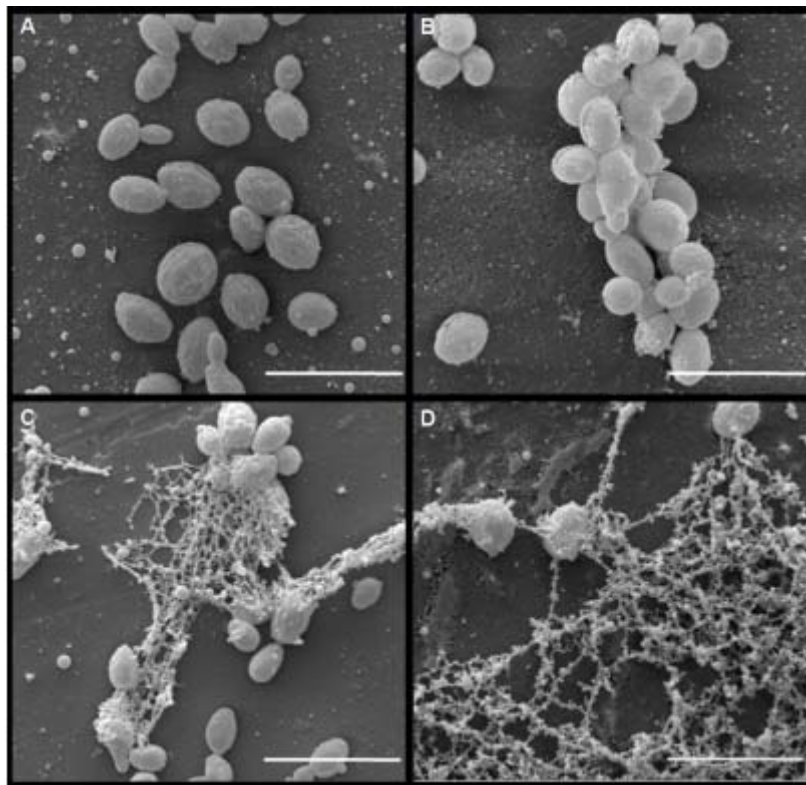


Como observado na Figura 8, o cultivo de *C. tropicalis*, em RPMI, foi caracterizado pela presença de blastoconídeos e células diferenciadas em hifas, além da ocorrência de material extracelular preferencialmente associado às hifas. No cultivo em presença de fluconazol (8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) as células mantiveram-se no formato de blastoconídeos, com arranjo agrupado, e presença de material extracelular.

Já no tratamento com baicaleína (10 μmol^{-1}), as células apresentaram-se como hifas e blastoconídeos, semelhante ao observado no meio RPMI (controle), no entanto, alguns blastoconídeos mostraram-se mais alongados, em relação aos demais tratamentos. Nesta condição de cultivo, a quantidade de material extracelular associado às hifas foi visivelmente superior quando comparado ao crescimento em RPMI. No cultivo em presença de fluconazol e baicaleína (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,5 μmol^{-1} , respectivamente) as células também apresentaram-se como blastoconídeos, com ausência de diferenciação em formas filamentosas, e presença

de material extracelular em quantidades superiores ao observado nas demais condições de cultivo.

Figura 9 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de células de *C. parapsilosis* 153.07, cultivadas RPMI (A), em presença de fluconazol (B), em presença de baicaleína (C), e em presença de fluconazol + baicaleína (D). Aumento de 6000 vezes. Barra 10 μ m.



Já para *C. parapsilosis* (Figura 9), o cultivo em RPMI foi caracterizado pela presença de células exclusivamente no formato leveduriforme, com a presença de pouca quantidade de material extracelular. No cultivo em presença de fluconazol ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) as células mantiveram-se no formato de blastoconídeos, com arranjo agrupado, e presença de material extracelular. Já no tratamento com baicaleína ($50 \mu\text{mol}^{-1}$), as células apresentaram-se como blastoconídeos, semelhante ao observado no meio RPMI (controle), no entanto, houve um discreto alongamento na morfologia das células, e observou-se uma quantidade maior de material extracelular, quando comparado ao controle. No cultivo em presença de fluconazol e baicaleína ($0,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{mol}^{-1}$, respectivamente) as células também apresentaram-se como blastoconídeos, e

presença de material extracelular em quantidades superiores ao observado nas demais condições de cultivo.

Candida possui a habilidade de diferenciação celular, da forma leveduriforme para a forma de pseudo-hifa e hifa. Neste trabalho, a presença de hifas foi observada em *C. albicans* em todos os tratamentos, exceto na presença de fluconazol. Na combinação sinérgica, o fluconazol não foi capaz de inibir a diferenciação celular em hifa. Entretanto, para *C. tropicalis*, a presença de hifas foi observada no controle e no tratamento com baicaleína, mas não foi observada no tratamento com fluconazol e na combinação sinérgica entre baicaleína e fluconazol, o que sugere que o fluconazol possa ter inibido a diferenciação celular na forma filamentosa, para *C. tropicalis*, nas condições testadas.

Já para *C. parapsilosis*, não foi observada a diferenciação celular na forma filamentosa em nenhuma das concentrações testadas. Conforme revisado por Endo e colaboradores (2010), espécies de *Candida* podem crescer em diferentes morfologias celulares, como blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas. Esta habilidade de mudar a morfologia de blastoconídeo a hifa em resposta a diversos sinais ambientais não é somente inerente à sua patogenicidade, mas também oferece um excelente paradigma para compreender as vias de sinalização que coordenam o crescimento e desenvolvimento celular.

Khodavandi e colaboradores (2011) mostraram o efeito do fluconazol sobre a morfologia e arranjo celular de *C. albicans*. Segundo os autores células tratadas com concentrações de fluconazol correspondentes a 10 vezes o valor de CIM sofreram destruição da superfície celular. No nosso experimento, o valor de CIM de fluconazol ($16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi testado, e não mostrou alteração na morfologia celular de *Candida*, apenas no arranjo celular, mostrando um agrupamento celular não observado no controle. Endo e colaboradores (2010) mostraram este mesmo comportamento, em células de *C. albicans*. Quando tratadas com fluconazol ($15,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), as células mostraram-se agrupadas, na forma de blastoconídeos, sem a presença de hifas e pseudo-hifas.

Em nossos experimentos, foi observada a produção aumentada de material extracelular pelas três espécies de *Candida* quando submetidas a tratamento com baicaleína sozinha ou em associação com fluconazol. O material extracelular apresenta-se no formato floculento, disposto em cadeias e homoganeamente distribuído. Nos cultivos em RPMI houve produção deste material,

em quantidades reduzidas, quando comparados aos outros tratamentos. Para *C. albicans*, não foi possível observar diferença na quantidade de material extracelular no tratamento com baicaleína e na combinação sinérgica entre baicaleína e fluconazol (Figura 8). Além disso, foi possível observar a ocorrência deste material extracelular intimamente relacionado com as estruturas filamentosas, sem ocorrência deste material associado aos blastoconídeos, a não ser no tratamento com fluconazol, em quantidades muito inferiores.

Para *C. tropicalis*, houve presença de material extracelular associado tanto a blastoconídeos e formas filamentosas. Cabe aqui ressaltar que a produção de material extracelular foi mais expressiva no tratamento sinérgico entre baicaleína e fluconazol, quando comparado aos outros tratamentos.

Em *C. parapsilosis*, não houve formação de formas filamentosas em nenhum dos tratamentos, e foi observada uma expressiva produção de material extracelular quando as células foram submetidas ao tratamento com baicaleína, e essa produção foi ainda mais expressiva no tratamento sinérgico. Apesar da ocorrência de material extracelular estar intimamente associado às formas filamentosas em *C. albicans*, a presença de material extracelular, não têm correlação com a presença das mesmas, de modo que ocorreu sem a presença de hifas, no sinergismo, em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Conforme revisado por Baillie e Douglas (2000), este material extracelular é composto primariamente de exopolissacarídeos, além de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes.

A produção de material extracelular pode estar intimamente associada à resistência de *Candida* em biofilmes, mas não é causa principal da resistência aos antifúngicos nesta estrutura. Conforme revisado por Kumamoto (2002), a expressão aumentada de determinados genes na estrutura do biofilme é também um dos responsáveis pela resistência às drogas antifúngicas. Com base nos nossos dados, é possível sugerir que as células tenham respondido aos compostos formando uma estrutura —tipo-biofilme, com produção de material extracelular, em resposta ao contato com os compostos baicaleína e fluconazol.

É importante reiterar que essa resposta, de produção acentuada de material extracelular, por células de *Candida* ocorreu quando as células foram submetidas à concentrações sinérgicas significativamente inferiores às usadas nos tratamentos com os compostos isolados, mostrando, mais uma vez, a efetividade sinérgica entre baicaleína e fluconazol, nas condições testadas neste experimento.

Esses dados confirmam o potencial sinérgico dos compostos fluconazol e baicaleína, pois mesmo usados em concentrações menores, quando combinados, tiveram maior efetividade tanto na inibição, quanto na resposta, mostrada com a produção de material extracelular pelas células de *Candida*.

Não foram encontrados na literatura trabalhos relacionados à atividade antifúngica de baicaleína contra *C. tropicalis* e de sinergismo com fluconazol sobre *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, sendo esta a primeira ocorrência relatada. Este trabalho reporta pela primeira vez a atividade antifúngica da baicaleína sobre *C. tropicalis*, a influência deste flavonóide nos tempos de geração das cepas/isolados testados, o sinergismo de baicaleína com fluconazol sobre *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, bem como as análises ultraestruturais de células em cultivo com baicaleína e a combinação sinérgica com o fluconazol. Os dados mostraram que baicaleína, além de atuar significativamente na inibição do crescimento, teve potencial sinérgico na aplicação com fluconazol, mostrando-se promissor na atuação conjunta na inibição de isolados resistentes de *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 46, p. 397-403, 2000.
- BONAPACE, C. R.; BOSSO, J. A.; FRIEDRICH, L. V.; WHITE, R. L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 144, p. 363-366, 2002.
- BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary Hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1-5, 2010.
- CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; WANG, Y.; HUANG, S.; XU, Y. G.; CAO, Y. B.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 73-77, 2008.
- CHANG, P. C.; LI, H. Y.; TANG, H. J.; LIU, J. W.; WANG, J. J.; CHUANG, Y. C. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 56-61, 2007.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINI, M. L. M.; KUSSANO, E. J. U.; NUCCI, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 41, p. 235-239, 2003.
- DAI, B. D.; CAO, Y. Y.; HUANG, S.; XU, Y. G.; GAO, P. H.; WANG, Y.; JIANG, Y. Y. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 803-809, 2009.
- ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans* **Research in Microbiology**, v. 161, p. 534-540, 2010.
- HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-639-652, 2008.

- HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.
- HUANG, S.; CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; SUN, X. R.; ZHU, Z. Y.; CAO, Y. B.; WANG, Y.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 2234-2236, 2008.
- IWAZAKI, R. S.; ENDO, E. H.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, V. C.; GARCIA, L. B.; FILHO, B. P. D. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 201-205, 2010.
- JUDD, W. R.; MARTIN, C. A. Antifungal activity of non-traditional antifungal agents. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p. 86-95, 2009.
- KANG, K.; FONG, W. P.; TSANG, P. W. K. Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. **Mycopathologia**, v. 170, n. 6, p. 391-396, 2010.
- KHODAVANDI, A.; ALIZADEH, F.; HARMAL, N. S.; SIDIK, S. M.; OTHMAN, F.; SEKAWI, Z.; JAHROMI, M. A. F.; NG, K. P.; CHONG, P.P. Comparison between efficacy of allicin and fluconazole against *Candida albicans* invitro and in a systemic candidiasis mouse model. **FEMS Microbiology Letters**, v. 315, p. 87-93, 2011.
- KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1302-1309, 2002.
- KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 608-611, 2002.
- LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.
- LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 693-696, 2003.
- MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; BOLLAREDDY, E.; KESKAR, K.; THORAT, A.; CRANKSHAW, D. J.; HOLLOWAY, A. C.; KHAN, G.; WRIGHT, G. D.; EJIM, L. Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2040-2045, 2009.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JUNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, 2007.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS)
Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada, M27-A2 – Segunda Edição, v. 22, n. 15, 2002.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, v. 1, p. 1, 2003.

PEREIRA, G. H.; MÜLLER, P. R.; SZESZS, M. W.; LEVIN, A. S.; MELHEM, M. S. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, p. 839-42, 2010.

QUAN, H.; CAO, Y. Y.; XU, Z.; ZHAO, J. X.; GAO, P. H.; QUIN, X. F.; JIANG, Y. Y. Potent in vitro synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1096-1099, 2006.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1-8, 1995.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROTA, J. F. **Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina.** 2009. 95p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistémico **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, p. 33-362, 2009.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SISTI, M.; SANTI, M.; FRATERNALE, D.; NINFALI, P.; SCOCCIANI, V.; BRANDI, G. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, p. 946-950, 2008.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292, 2005.

UZUN, O.; ARIKAN, S.; KOCAGÖZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, p. 101-107, 2000.

PARTE II

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CRISINA EM *CANDIDA* SPP.

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas na forma comensal em hospedeiros humanos, compondo a microbiota normal de pele e mucosas. Devido à complexidade genética apresentada pelas espécies do gênero, estas leveduras podem colonizar e causar infecções em vários sítios anatômicos distintos. Desta forma, leveduras do gênero *Candida* são os principais patógenos relacionados a infecções fúngicas em humanos, provocando altos índices de morbidade e mortalidade (revisado por MAVOR et al., 2005).

Candida albicans foi, até recentemente, a espécie de maior frequência clínica em casos de infecções por *Candida*. Contudo, nos últimos anos houve um aumento na frequência de espécies de *Candida* não-*albicans*, principalmente *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, associados a estas infecções (HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; revisado por NUCCI et al., 2010).

No Brasil, além da resistência intrínseca associada à *Candida krusei* e *Candida glabrata*, outras espécies de *Candida* comumente sensíveis ao fluconazol têm apresentado resistência adquirida nos últimos anos, e essa resistência pode estar associada à prévia exposição aos antifúngicos na terapia clínica (COLOMBO et al., 2003; revisado por RIBEIRO et al., 2004; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; revisado por NUCCI et al., 2010; PEREIRA et al., 2010).

Nos últimos anos, têm se observado um aumento no interesse pela busca de compostos vegetais que possam atuar como antimicrobianos (HAN et al., 2009; JUDD; MARTIN, 2009). Dentre estes compostos, estão os flavonóides, compostos produzidos por plantas em resposta ao ataque de patógenos (revisado por ANGELO; JORGE, 2007). A crisina é uma flavona com duas hidroxilas nas posições 5 e 7, e possui atividade anti-viral, antifúngica e antibacteriana (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005; BABU et al., 2006; SHIMURA et al., 2007).

Alguns trabalhos associam a atividade antifúngica da própolis à crisina (UZEL et al., 2005; MERCAN et al., 2006) entretanto, até o momento, não

foram encontrados dados na literatura acerca da atividade antifúngica da substância isolada.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica da crisina sobre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, bem como avaliar a atividade deste flavonóide nas diferentes fases da curva de crescimento e tempos de geração nestas espécies.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *CANDIDA* SPP

As cepas utilizadas neste experimento pertencem ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina. As cepas *C. albicans* ATCC 64548, *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram gentilmente cedidas pela Dr^a Marcia de Souza Carvalho Melhem, do Instituto Adolfo Lutz. Os isolados de *C. tropicalis* 186.06 e *C. parapsilosis* 153.07, também utilizados neste estudo, foram previamente isolados de secreção traqueal e urina, respectivamente, de pacientes do Hospital Universitário da UEL (ROTA, 2009).

Os isolados foram identificados utilizando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com o uso de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (LI et al., 2003; TAVANTI et al., 2005).

As cepas e isolados foram cultivados em Sabouraud dextrose caldo, a 37°C por 48 h. Após, foram esgotados em Sabouraud dextrose ágar, para obtenção de colônias isoladas. As amostras foram então repicadas para Sabouraud dextrose caldo esterilizado e conservadas a 4°C, como estoque inicial, que foi utilizado durante o experimento.

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA CRISINA

A técnica utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima da crisina foi a de Microdiluição em Caldo, proposta pelo NCCLS, Normativa Aprovada M27-A2 (NCCLS, 2002), com adaptações. O meio utilizado foi o RPMI 1640, com glutamina, sem bicarbonato e sem a adição de Vermelho de Fenol, tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico], concentração final de 0,165 mol.L⁻¹, pH 7,0, acrescido de 3% (v/v) de Tween 80 (VETEC®) e 1% (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO - VETEC®).

A crisina (CAS 480-40-0, Sigma-Aldrich, 97%) foi previamente diluída em DMSO puro, e então adicionada ao meio RPMI 1640 acrescido de 3% de Tween 80, nas concentrações de 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 e 2000 µmol.L⁻¹. Alíquotas de 100 µL de meio RPMI 1640 com cada concentração da crisina foram

adicionadas à microplacas de fundo chato, estéreis, respeitando as ordens de concentração.

A partir do estoque, cada cepa/isolado foi cultivado em Sabouraud dextrose caldo, por 24 h a 37°C. Células deste cultivo foram ajustadas em solução salina 0,85% (p/v) para a concentração de 2×10^6 células.mL⁻¹, confirmada por contagem celular em Câmara de Neubauer, e imediatamente foram semeadas alíquotas de 100 µL nas placas que já continham as concentrações do flavonóide. A concentração final dos inóculos foi de aproximadamente 10^6 células.mL⁻¹. As concentrações finais da crisina foram de 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µmol.L⁻¹. Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Os controles utilizados foram cavidades contendo meio RPMI 1640 acrescido de Tween 80 e DMSO e meio RPMI 1640 acrescido de Tween 80 e DMSO inoculado com cada cepa/isolado testados. O meio RPMI acrescido de Tween 80 e DMSO e com as concentrações da crisina, sem cultivo fúngico, foram utilizados para excluir a possibilidade de contaminação e como branco para a leitura. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Asys HiTech UVM 340), a 590 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A determinação da Concentração Inibitória 50 (CI 50) foi então determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico dado pela densidade ótica, quando comparado ao controle (sem o flavonóide).

2.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DA BAICALEÍNA NAS DIFERENTES ETAPAS DE CULTIVO

A avaliação da atividade da crisina na cinética de crescimento populacional foi avaliada pela obtenção de curvas de crescimento microbiano. Alíquotas de 50 mL de meio RPMI 1640, acrescido de 3% (v/v) de Tween 80 e 1% (v/v) de DMSO, com presença e ausência de crisina a 1000 µmol.L⁻¹, foram inoculadas com 10^4 células.mL⁻¹ de cada cepa/isolado testados, e incubados a 37°C e 180 rpm. Alíquotas foram retiradas a cada duas horas até 24 h e após, em 48 h. Para a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC.mL⁻¹), foram feitas diluições conforme o tempo de cultivo, e 50 µL foram semeados em placas de Sabouraud dextrose ágar. As placas foram incubadas por

48 h a 37°C, e então foi realizada a contagem do número de UFC.mL⁻¹. Ainda, a concentração celular foi determinada em espectrofotômetro, a 590 nm. Também foram realizadas análises dos tempos de geração nas diferentes curvas de crescimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE INIBITÓRIA

Para a determinação da concentração inibitória mínima de crisina para cepas/isolados de *Candida* spp foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, baseada no NCCLS (2002).

As concentrações de crisina utilizadas foram de 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, conforme descrito no item 2.3. A determinação da Concentração Inibitória 50 (CIM 50) foi considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico quando comparado ao controle (ausência do flavonóide).

Os dados da Tabela 1 mostram que houve variação quanto aos valores de CIM 50 para as diferentes cepas/isolados testados. Os menores valores foram obtidos para *C. albicans* ATCC 64550, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. parapsilosis* 153.07, com CIM 50 de 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Entre as *C. tropicalis* testadas não houve diferença nos valores de CIM 50, ambas *C. tropicalis* ATCC 200956 e 186.06 foram inibidas a 800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tabela 1 – Valores de CIM 50 de crisina para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Cepas/isolados	CIM 50 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	800
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	600
<i>C. tropicalis</i> 186.06	800
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	800
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	600
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	600

Conforme os itens 2.2 e 3.1, na primeira parte deste trabalho, foram realizadas as avaliações de suscetibilidade destas cepas/isolados de *Candida* frente ao fluconazol. Os menores valores de CIM 50 para o fluconazol foram obtidos para *C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* 186.06, *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, com as CIM 50 variando entre 0,25 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para *C.*

albicans ATCC 64550 e *C. parapsilosis* 153.07, os valores de CIM 50 variaram de 8 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Baseado nas diretrizes propostas pelo NCCLS (2002), apenas *C. albicans* ATCC 64550 e *C. parapsilosis* 153.07 foram considerados sensíveis dose-dose-dependentes, sendo todos as outras cepas/isolados testados considerados como sensíveis.

C. albicans ATCC 64548 é sensível ao fluconazol, e foi inibida pela crisina em uma concentração maior (800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) que *C. albicans* ATCC 64550 (600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), que apresenta suscetibilidade dose-dependente para o fluconazol. Estes dados mostram que a crisina foi mais efetiva na inibição de uma cepa sensível dose-dependente ao fluconazol, quando comparada a uma cepa sensível.

Esta diferença não foi encontrada para *C. parapsilosis* ATCC 22019, sensível ao fluconazol, e *C. parapsilosis* 153.07, sensível dose-dependente, de modo que ambas apresentaram CIM 50 de 800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Não foram encontrados na literatura, dados de inibição de espécies de *Candida* pela crisina. Moshi e colaboradores (2004) testaram a mistura da crisina com outro composto, uma chalcona, e obtiveram valores de CIM de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *C. albicans*, sendo este o primeiro relato para essa combinação. Neste experimento, mostramos inibição de duas cepas de *C. albicans* com valores de CIM 50 de 800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (192 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (144 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Não há correlação entre os dados, pois diferentes técnicas foram utilizadas. Ainda, neste experimento, a crisina foi testada pura, sem a presença de outros compostos.

Entretanto, outros trabalhos reportam a atividade antimicrobiana da crisina. Shimura e colaboradores (2007) reportaram atividade antifúngica da crisina sobre fungos simbióticos, inibindo o crescimento micelial a 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Babu e colaboradores (2006) testaram a atividade antibacteriana da crisina e encontraram inibição do crescimento de duas espécies de *Bacillus*, de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum* em concentrações entre 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Diversos trabalhos reportam que a crisina, por ser um dos componentes majoritários da própolis, pode ser a responsável pela atividade antimicrobiana deste produto vegetal, entretanto, até o momento não foram encontrados dados na literatura relativos à sua atividade antifúngica sobre diferentes espécies de *Candida* (POPOVA et al., 2005; SILICI; KUTLUCA, 2005; UZEL et al., 2005; KATIRCIO; MERCAN, 2006; MERCAN et al., 2006; SILICI et al., 2007;

CHAILLOU; NAZARENO, 2009). Este trabalho, portanto, é o primeiro a relatar a atividade antimicrobiana da crisina sobre espécies de *Candida*.

3.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE CRISINA NAS DIFERENTES ETAPAS DE CULTIVO

A ação da crisina nas diferentes fases do crescimento populacional foi avaliada pela obtenção de curvas de crescimento na ausência e presença do flavonóide ($1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Os dados estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

A partir dos dados obtidos, é possível afirmar que houve uma discreta queda nos valores de DO nos cultivos em presença de crisina, quando comparados ao controle (ausência de crisina). As maiores diferenças entre controle e tratamento com crisina foram observados para ambas cepas de *C. albicans* e cepa/isolado de *C. tropicalis*, e a menor diferença foi observada para cepa/isolado de *C. parapsilosis*.

Figura 1 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas de *C. albicans* na ausência (controle) e presença de crisina.

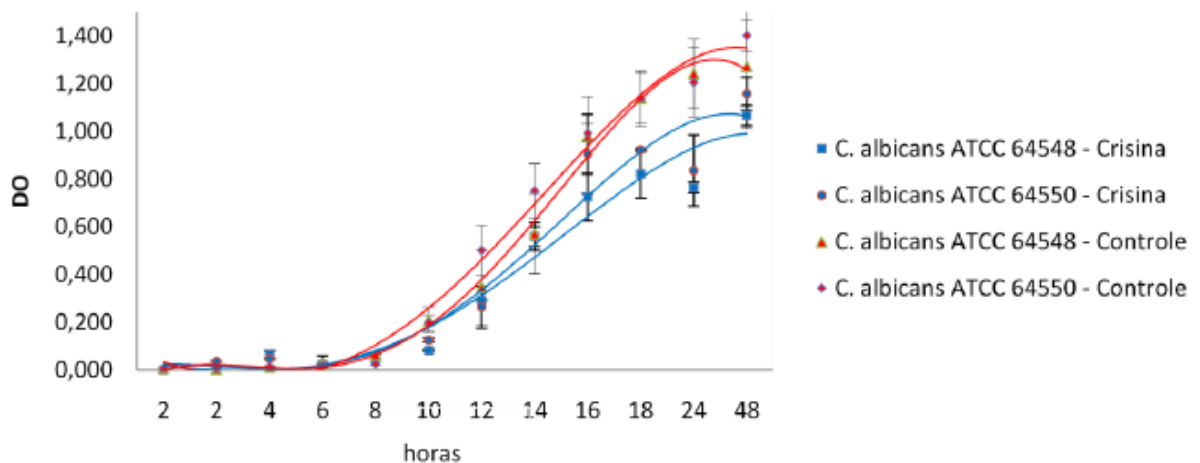


Figura 2 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de crisina.

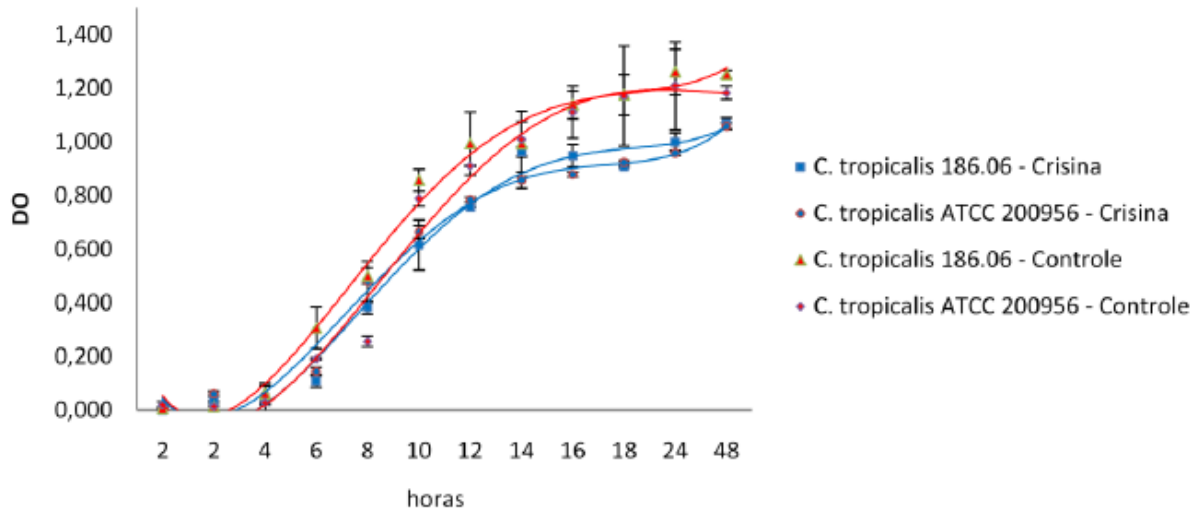
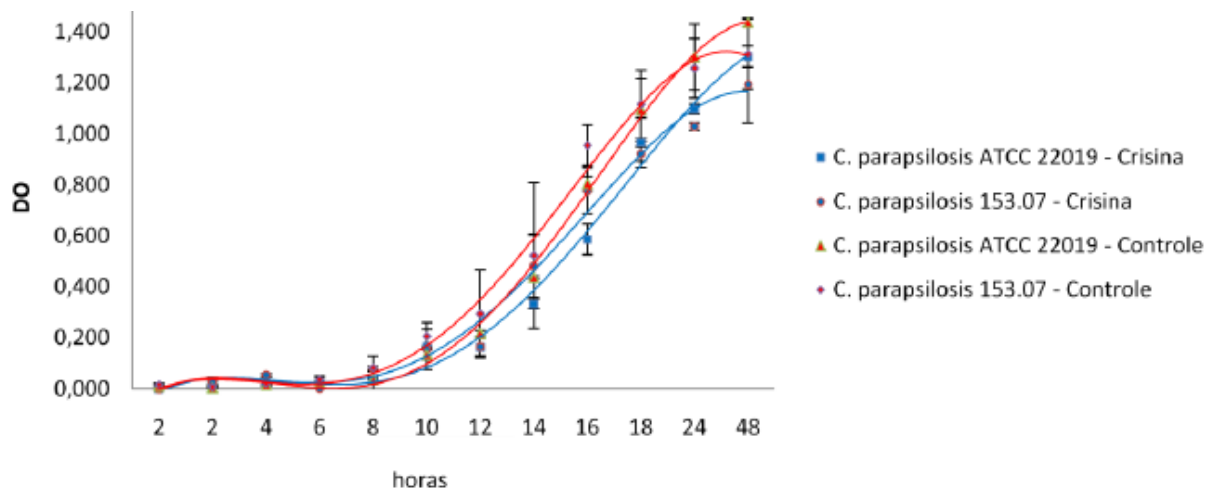


Figura 3 – Curvas de crescimento (dados expressos em DO) de cepas/isolados de *C. parapsilosis* na ausência (controle) e presença de crisina.



Há duas diferenças entre os testes de atividade antifúngica da crisina e as curvas de crescimento. A atividade antifúngica foi avaliada sobre um inóculo de 10^6 células.mL⁻¹, e sem agitação. As curvas foram feitas com inóculo inicial 10^4 células.mL⁻¹, com agitação de 180 rpm.

Conforme revisado por Ostrosky e colaboradores (2008), o inóculo e as condições de incubação são importantes fatores a serem considerados na atividade antimicrobiana de materiais vegetais.

Jung e colaboradores (2007) reportaram em seu estudo que a entrada de um flavonóide, de nome amentoflavona, na célula de *C. albicans* não tem relação direta com a produção de ATP, ou seja, a entrada da amentoflavona na

célula fúngica não está mediada por funções celulares que necessitem de consumo energético celular, como transportadores dependentes de ATP. Os dados relacionados a este experimento mostram que o cultivo em agitação, associado ou não a um menor inóculo, favoreceu a resistência das espécies de *Candida* testadas à crisina, e esta relação pode estar associada à maior aeração, por conseguinte maior disponibilidade de oxigênio no meio de crescimento.

Muitos micro-organismos são capazes de metabolizar compostos fenólicos, dentre eles, espécies de *Candida*, por diversos mecanismos (AGARRY et al., 2008; VARMA e GAIKWAD, 2008; COIMBRA et al., 2009). Para a degradação do fenol, os fungos são capazes de adicionar e remover hidroxilas de compostos aromáticos e grande número de arranjos pode ser formado. Geralmente, a degradação do fenol é realizada via catecol, chave da metabolização de vários compostos aromáticos pelos micro-organismos, pois a partir dele ocorre a quebra do anel aromático para futura assimilação (MELO et al., 2005). Estes dados sugerem que *Candida* possa ter, nestas 4 a 6 horas de cultivo inicial, produzido compostos capazes de degradar ou metabolizar este composto fenólico, permitindo seu crescimento.

Conforme dados da Tabela 2, os maiores aumentos nos tempos de geração, após o cultivo em presença de crisina, foram observados para a cepa de *C. albicans* ATCC 64548 (aumento de 2,1 vezes), seguida de *C. albicans* ATCC 64550 e *C. parapsilosis* 153.07 (aumento de 1,8 vezes) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (aumento de 1,6 vezes), não havendo diferença entre as duas amostras testadas de cada espécie entre si. Porém, houveram diferenças estatísticas entre *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 64548.

Tabela 2 – Tempos de geração de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* após cultivo em ausência (controle) e presença de crisina.

Cepas/isolados	Tempo de Geração*	
	Controle**	Crisina
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	105 ^a	230 ^c
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	121 ^a	224 ^{bc}
<i>C. tropicalis</i> 186.06	136 ^a	118 ^a
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	122 ^a	108 ^a
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	112 ^a	182 ^b
<i>C. parapsilosis</i> 153.07	111 ^a	201 ^{bc}

*Em minutos;

**Letras diferentes indicam diferenças estatísticas quando comparados pelo teste Tukey (P<0,01).

Para *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. tropicalis* 186.06, não houve diferença entre os tempos de geração, nem quando comparados aos controles, nem entre si.

Yang e colaboradores (2000) sugerem, em seu estudo, que a atividade do composto baicaleína, também mostrado na primeira parte deste trabalho, pode ser atribuída à presença de uma hidroxila como radical na posição 7 da molécula. Entretanto, como mostrado na Figura 3 da revisão bibliográfica, a crisina também possui uma hidroxila como radical na posição 7 do anel, e mostrou atividade antifúngica em uma das condições testadas, mas esta atividade não foi mostrada no crescimento obtido pelas curvas de crescimento, o que não ocorreu com a baicaleína, que mostrou atividade em ambas as condições testadas.

Este trabalho reporta, pela primeira vez, a atividade antifúngica do composto crisina em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, como composto isolado, bem como sua influência nas diferentes etapas de cultivo e tempos de geração das três espécies de *Candida* testadas. Neste trabalho, foi mostrado que a crisina foi capaz de inibir o crescimento fúngico das três espécies de *Candida*, porém este mesmo nível de inibição não foi obtido em um inóculo menor, associado a um cultivo em agitação.

REFERÊNCIAS

- AGARRY, S. E.; DUROJAIYE, A. O.; SOLOMON, B. O. Microbial degradation of phenols: a review, **International Journal Environment and Pollution**, v. 32, p. 12-28, 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- BABU, K. S.; BABU, T. H.; SRINIVAS, P. V.; KISHORE, K. H.; MURTHYB, U. S. N.; RAOA, J. M. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 221-224, 2006.
- BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary Hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1-5, 2010.
- CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M. A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1422-1427, 2009.
- COIMBRA, C. D.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245-251, 2009.
- COLOMBO, A. L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINI, M. L. M.; KUSSANO, E. J. U.; NUCCI, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 41, p. 235-239, 2003.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.
- HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *C. albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.
- HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.
- JUDD, W. R.; MARTIN, C. A. Antifungal activity of non-traditional antifungal agents. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p. 86-95, 2009.
- JUNG, H. J.; PARK, K.; LEE, I. S.; KIM, H. S.; YEO, S. H.; WOO, E. R.; LEE, D. G. S-phase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamarascina*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1969-1971, 2007.

KATIRCIO, H.; MERCAN, N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1151-1153, 2006.

LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 693-696, 2003.

MAVOR, A.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process, and virulence attributes. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 863-874, 2005.

MELO, J. S.; KHOLI, S.; PATWARDHAN, A. W.; D'SOUZA, S. F. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 625-628, 2005.

MERCAN, N. Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 56, p. 373-378, 2006.

MOSHI, M. J.; JOSEPH, C. C.; INNOCENT, E.; NKUNYA, M. H. H. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of extracts and compounds from *Uvaria scheffleri* **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 269-273, 2004.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS) **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada, M27-A2 – Segunda Edição**, v. 22, n. 15, 2002.

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

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, G. H.; MÜLLER, P. R.; SZESZS, M. W.; LEVIN, A. S.; MELHEM, M. S. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, p. 839-42, 2010.

POPOVA, M.; SILICI, S.; KAFTANOGLU, O.; BANKOVA, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, v. 12, p. 221-228, 2005.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, p. 106-128, 2004.

ROTA, J. F. **Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina**. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

SHIMURA, H.; MATSUURA, M.; TAKADA, N.; KODA, Y. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 1442-1447, 2007.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SILICI, S.; KOC, A. N.; MISTIK, S. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses **Annals of Microbiology**, v. 57, p. 269-272, 2007.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292, 2005.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONÇAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

VARMA, R. J.; GAIKWAD, B. G. Rapid and high biodegradation of phenols catalyzed by *Candida tropicalis* NCIM 3556 cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 431-435, 2008.

YANG, D.; HU, H.; HUANG, S.; CHAUMONT, J. P.; MILLET, J. Study on the inhibitory activity, *in vitro*, of baicalein and baicalin against skin fungi and bacteria. **Zhong Yao Cai**, v. 23, p. 272-274, 2000.

4 CONCLUSÕES

- Os compostos baicaleína e crisina foram efetivos na inibição de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*;
- As três espécies responderam de maneira diferenciada aos compostos, sendo observadas também diferenças nas respostas de diferentes isolados de cada espécie;
- A baicaleína foi capaz de alterar as etapas de cultivo das diferentes espécies de *Candida* testadas, com alterações nos tempos de geração das células;
- A crisina não alterou as etapas de cultivo de *Candida*, mas alterou os tempos de geração das células;
- A baicaleína apresentou efeito sinérgico com o fluconazol, sobre espécies sensíveis e sensíveis dose-dependentes de *Candida*;
- A baicaleína gerou alterações ultraestruturais ao nível morfológico e no arranjo celular das três espécies de *Candida* testadas;
- O fluconazol gerou alterações no arranjo celular das três espécies de *Candida* testadas;
- O fluconazol inibiu a diferenciação de *C. tropicalis* na forma filamentosa, quando associado com baicaleína;
- A combinação sinérgica entre fluconazol e baicaleína gerou alterações morfológicas e de arranjo celular, e gerou aumento na produção de material extracelular por parte das células de *Candida*.