



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ROSANA DE SOUSA CAMPOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PALMATINA FRENTE A ISOLADOS DE
CANDIDA SPP. RESISTENTES A AZÓLICOS E SUA ATIVIDADE CONTRA
BIOFILME FORMADO E EM FORMAÇÃO**

FORTALEZA

2017

ROSANA DE SOUSA CAMPOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PALMATINA FRENTE A ISOLADOS DE
CANDIDA SPP. RESISTENTES A AZÓLICOS E SUA ATIVIDADE CONTRA
BIOFILME FORMADO E EM FORMAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

FORTALEZA

2017

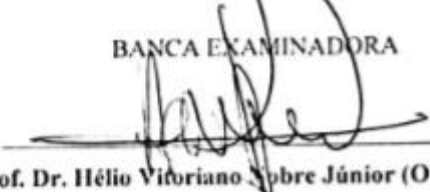
ROSANA DE SOUSA CAMPOS


**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PALMATINA FRENTE A ISOLADOS DE
CANDIDA SPP. RESISTENTES A AZÓLICOS E SUA ATIVIDADE CONTRA
BIOFILME FORMADO E EM FORMAÇÃO**

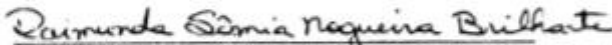
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica.


Aprovada em: 23/ 02/ 2017.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Profa. Dra. Raimunda Samia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Profa. Dra. Julianna Navarro Ueda Yachite
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C216a Campos, Rosana.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PALMATINA FRENTE A ISOLADOS DE CANDIDA SPP.
RESISTENTES A AZÓLICOS E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME FORMADO E EM
FORMAÇÃO / Rosana Campos. – 2017.

104 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. Candida spp. 2. Palmatina. 3. Biofilme. 4. Citometria de fluxo. 5. Análise proteômica. I. Título.

CDD 616.9

À Deus e família.

AGRADECIMENTO

A Deus por me conceder força, entendimento, coragem e esperança para seguir em frente e por colocar em meu caminho pessoas dispostas a ajudar.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante todo o período do doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior pela confiança depositada, pela chance concedida, por acreditar que eu poderia fazer um bom trabalho. Agradeço a todos os conselhos, aos ensinamentos não só na área técnica, mas principalmente, pelos ensinamentos de como enxergar a realidade e saber conviver com todas as adversidades que nos cerca.

Aos professores membros da banca que se dispuseram a estarem presentes, doando o seu tempo, seu conhecimento, contribuindo para a melhoria do trabalho apresentado.

Aos amigos que fizeram parte dessa trajetória ao longo desses anos, não só de doutorado, mas de mestrado e que sempre ajudaram a tornar a caminhada mais leve. Meus sinceros agradecimentos a Cecília Rocha, João Batista, Francisca Bruna, Letícia Sampaio, Anderson Ramos que formam uma verdadeira família LABEL por todos os momentos compartilhados, por serem tão prestativos e sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos meus pais, João Ferreira Campos e Maria Luzinette de Sousa Campos, que sempre lutaram para deixar o melhor que puderam para mim, os estudos. Vocês me ensinaram a correr atrás dos objetivos e a ser perseverante, a ter fé e não desistir diante das dificuldades. Vocês são um motivo de grande orgulho e esse título é a concretização de que seus esforços nunca foram em vão.

Ao meu marido Paulo Rafael Lima Lopes, por aguentar as minhas chatices, por acreditar em mim muito mais do que eu mesma. A minha filha Letícia de Sousa Lima, por ser o grande amor da minha vida, por me fazer lembrar que a cada dia, nasce uma oportunidade de sermos pessoas melhores.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pela oportunidade de fazer parte do seu corpo docente. A todos os professores que ministraram disciplinas e compartilharam os seus conhecimentos adquiridos.

Agradeço aos laboratórios parceiros do LABEL. À professora Marina pela execução da proteômica. Ao Dr. Bruno Coelho Cavalcanti pelos os experimentos, idéias e conhecimento partilhados na elaboração não só deste trabalho, mas de muitos outros que são desenvolvidos no LABEL.

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

(Isaac Newton)

RESUMO

Atualmente, a incidência das infecções fúngicas vem aumentando e em posição de destaque, as causadas por espécies do gênero *Candida*, a qual é o microrganismo mais isolado em sepsis hospitalar. A espécie mais frequentemente isolada era *Candida albicans*, mas esse panorama vem mudando com o aumento de espécies não *albicans*, as quais apresentam uma maior resistência ao fluconazol. Devido ao problema de resistência e o fato de haver poucos fármacos antifúngicos disponíveis no mercado, faz-se necessário a busca por novos fármacos. Neste contexto, houve interesse em estudar a palmatina que é um alcalóide isoquinolínico, há anos já vem sendo usado na medicina tradicional chinesa apresentando várias propriedades farmacológicas, inclusive antifúngica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica da palmatina frente às cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos. A metodologia utilizada para verificar a ação antifúngica foi a técnica de microdiluição em caldo. Foi realizados testes de citometria de fluxo para elucidar os possíveis mecanismos de morte envolvidos. A ação anticandida da palmatina foi verificada em biofilmes formados e em formação nas três principais espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*). A análise proteômica também foi utilizada como ferramenta no entendimento dos processos bioquímicos envolvidos na ação da palmatina e também foi realizado o teste de citotoxicidade em fibroblastos murino. Palmatina demonstrou atividade antifúngica com os CIM variando 32 a 128 µg/ mL. Verificou-se que a palmatina reduziu a densidade celular, causou danos ao DNA, promoveu despolarização mitocondrial, aumenta a externalização de fosfatidilserina, sugerindo morte celular por apoptose. Em biofilmes formados, palmatina reduziu em 50% a viabilidade celular do biofilme na concentração de 20x CIM (*C. albicans*) e 10x CIM (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Já em biofilmes em formação, a mesma porcentagem de inibição foi alcançada na concentração do CIM (*C. albicans*) e 2x CIM (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Análise proteômica de uma cepa de *C. albicans* exposta a palmatina demonstrou a super expressão de proteínas relacionadas à produção de energia e síntese de macromoléculas. Palmatina não demonstrou citotoxicidade quando avaliada na concentração de 100 µg/ mL em células L929 de fibroblasto murino. A ação antifúngica da palmatina em *Candida* spp. resistentes a azólicos na forma planctônica e em biofilme formados e em formação, assim como, ao fato de não ser citotóxica para células animais, apontam para uma promissora nova molécula ou protótipo anticandida.

Palavras-chave: *Candida* spp, palmatina, biofilme, citometria de fluxo, análise proteômica.

ABSTRACT

Currently, the incidence of fungal infections has been increasing and in a prominent position, those caused by species of the genus *Candida*, which is the most isolated microorganism in hospital sepsis. The most frequently isolated species was *Candida albicans*, but this scenario has been changing with the increase of non-*albicans* species, which are more resistant to fluconazole. Due to the resistance problem and the fact that there are few antifungal drugs available, it is necessary to search for new drugs. In this context, there was an interest in studying palmatine, which is an isoquinolinic alkaloid, which has been used in traditional Chinese medicine for several years, presenting several pharmacological properties, including antifungal. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of palmatine against resistant azoles *Candida* spp. The methodology used to verify the antifungal action was the broth microdilution technique. Flow cytometry tests were performed to elucidate the possible mechanisms of death involved. The anticancer action of palmatine was verified in biofilms formed and in formation in the three main *Candida* species (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*). Proteomic analysis was used to understand the biochemical processes involved in the action of palmatine and the cytotoxicity test was also performed on murine fibroblasts. Palmatine demonstrated antifungal activity with MICs ranging from 32 to 128 µg/ mL. It was found that cell viability was reduced by palmatine. Moreover, palmatine caused DNA damage, promoted mitochondrial depolarization, increased phosphatidylserine outgrowth, suggesting cell death by apoptosis. In biofilms formed, palmatine reduced the cellular viability of the biofilm in a concentration of 20x MIC (*C. albicans*) and 10x MIC (*C. tropicalis* and *C. parapsilosis*) by 50%. In biofilms in formation, the same percentage of inhibition was observed in the MIC concentration (*C. albicans*) and 2x MIC (*C. tropicalis* and *C. parapsilosis*). Proteomic analysis of a strain of *C. albicans* exposed to palmatine demonstrated the overexpression of proteins related to energy production and synthesis of macromolecules. Palmatine showed no cytotoxicity when evaluated at the concentration of 100 µg/ mL in murine fibroblast L929 cells. The antifungal action of palmatine observed in *Candida* spp. Resistant to planktonic and biofilm forming and forming biofilms, as well as being non-cytotoxic to animal cells, point to a promising new molecule anticandida.

Keywords: *Candida* spp, palmatine, biofilm, flow cytometry, proteomic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Alguns fatores de virulência em <i>Candida</i>	27
Figura 2- Áreas esquemáticas do corpo feminino susceptível a infecção por <i>Candida albicans</i>	29
Figura 3- Ciclo de vida do biofilme de <i>Candida albicans</i>	30
Figura 4- Estrutura química da palmatina.....	38
Figura 5- Avaliação da viabilidade celular em <i>C. albicans</i> resistente a azólicos exposta a palmatina em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo.....	60
Figura 6- Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em <i>C. albicans</i> resistentes à azólicos expostas a palmatina em diferentes intervalos de tempo avaliado pro citometria de fluxo.....	61
Figura 7- Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em <i>C. albicans</i> resistente à azólicos expostas a palmatina em diferentes intervalos de tempo avaliado pro citometria de fluxo.....	62
Figura 8- Externalização da fostatidilserina em <i>C. albicans</i> resistente a azólicos após 3, 6, 12 e 24 h de exposição a palmatina avaliado pro citometria de fluxo.....	63
Figura 9- Avaliação do índice de dano ao DNA em <i>C. albicans</i> resistente a azólicos através do ensaio do cometa versão alcalina e versão modificada (FPG) após 24 h de exposição.....	64
Figura 10- Atividade da palmatina frente ao biofilme formado de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> avaliado pelo método do MTT.....	71

Figura 11- Perfil da anfotericina B contra biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliado pelo método do MTT.....72

Figura 12- Atividade da palmatina na inibição da formação do biofilme em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliado pelo método do MTT.....72

Figura 13- Perfil da anfotericina B contra biofilme em formação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliado pelo método do MTT.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais fatores de risco associados à candidemia em um hospital terciário do Canadá.....	26
Tabela 2- Efeito antifúngico da palmatina contra cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos.....	57
Tabela 3- Efeito da Associação da palmatina (PALM) com itraconazol (ITC), fluconazol (FLC) e voriconazol (VRZ) contra cepas de <i>Candida</i> spp. à azólicos.....	58
Tabela 4- Efeito da associação da palmatina (PALM) com voriconazol (VRZ) em cepas de <i>Candida</i> spp. à azólicos.....	59
Tabela 5- Identificação de proteínas expressas no extrato total nas células de <i>Candida albicans</i> por espectrometria de massa quantitativa ESI-MS/MS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

24-SMT	24 metil transferase
ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCF	2',7' Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína não fluorescente
DTT	Ditiotereitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FICI	<i>Fractionary inhibitory concentration</i>
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
FPG	Formamidopirimidina DNA-glicosilase
H ₂ DCFDA	Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína
HEPES	N - (2-Hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
IAA	Iodoacetamida
ITRA	Itraconazol
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
MTT	Brometo de difeniltetrazólio –[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]
PALM	Palmatina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Iodeto de propídio
PPB	<i>Potassium Phosphate Buffer</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
Rh123	Rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SAP	<i>Secreted aspartyl proteinases</i>
SDD	Sensível dose-dependente
UFC/ mL	Unidades formadoras de colônia por mL
VRZ	Voriconazol
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Infecções fúngicas.....	21
2.2	Incidência de candidemias.....	22
2.3.	Gênero <i>Candida</i>	23
2.3.1	Principais espécies de <i>Candida</i>	24
2.4	Patogenia.....	25
2.5	Principais fatores de virulência.....	26
2.5.1	Aderência.....	27
2.5.2	Enzimas degradativas secretadas.....	27
2.5.3	Mudança morfológica.....	28
2.6	Biofilme.....	28
2.6.1	Características gerais.....	28
2.6.2	Etapas da formação do biofilme.....	30
2.6.3	Resistência antifúngica em biofilmes.....	31
2.6.4	Quorum- sensing.....	32
2.7	Antifúngicos.....	33
2.8	Resistência aos antifúngicos.....	35
2.9	Novas estratégias terapêuticas.....	36
2.10	Palmatina.....	37
2.10.1	Interação entre palmatina e DNA.....	40
3.	HIPÓTESES.....	41
4.	OBJETIVOS.....	42
4.1.	Objetivo geral.....	42
4.2.	Objetivos específicos.....	42
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5.1.	Recuperação das cepas.....	43
5.2.	Antifúngicos.....	43
5.3.	Teste de Sensibilidade aos antifúngicos.....	43
5.3.1.	CLSI.....	43
5.3.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos	

antifúngicos.....	44
5.3.3. Teste do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: <i>checkerboard</i>	45
5.3.4. Análise dos dados.....	45
5.4. Cultivo de células L929.....	46
5.4.1. A inibição da viabilidade de células L929 utilizando o teste MTT.....	46
5.5. Testes utilizando citometria de fluxo.....	46
5.5.1. Preparo das suspensões de células de <i>Candida</i> spp.....	46
5.5.2. Tratamento das células de <i>Candida albicans</i>	47
5.5.3. Determinação da viabilidade celular.....	47
5.5.4. Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células de <i>Candida albicans</i>	47
5.5.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio em células de <i>Candida</i> <i>albicans</i>	48
5.5.6. Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida</i> <i>albicans</i>	48
5.5.7. Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo.....	48
5.6. Ensaio do Cometa.....	48
5.6.1. Análise da oxidação de bases purinas do DNA.....	49
5.6.2. Análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa.....	50
5.7. Análise Proteômica em células de <i>Candida albicans</i> expostas a PALM.....	50
5.7.1. Preparo e tratamento das células de <i>Candida albicans</i>	50
5.7.2. Lise celular e solubilização de células de <i>C. albicans</i>	50
5.7.3. Identificação e quantificação de proteínas por espectrometria de massa.....	51
5.7.4. Processamento de dados e análise de expressão diferencial.....	52
5.8. Ensaio de Biofilme.....	52
5.8.1. Crescimento dos isolados de <i>Candida</i> spp. no modo biofilme.....	53
5.8.2. Determinação da atividade de PALM sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.....	53
5.8.3. Ação da PALM na inibição da formação de biofilme em <i>Candida</i> spp.....	54

5.8.4.	Análise dos dados dos resultados do biofilme.....	54
6.	RESULTADOS.....	56
6.1.	Ensaio de citotoxicidade da palmatina em células L929.....	56
6.2.	Atividade antifúngica da palmatina frente às cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos.....	56
6.3.	Avaliação da interação entre palmatina e azólicos.....	56
6.4.	Avaliação do possível mecanismo de morte celular.....	60
6.4.1.	Avaliação da viabilidade celular.....	60
6.4.2.	Despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	61
6.4.3.	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	62
6.4.4.	Externalização de fosfatidilserina.....	62
6.4.5.	Danos ao DNA.....	63
6.5.	Proteínas expressas em <i>Candida albicans</i> na forma plactônica após serem expostas a palmatina.....	64
6.6.	Determinação da atividade de palmatina sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.....	71
6.7.	Ação da palmatina na inibição da formação de biofilme em <i>Candida</i> spp.....	72
7.	DISCUSSÃO.....	74
8.	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXOS.....	95
	APÊNDICE.....	102

1. INTRODUÇÃO

A incidência das infecções fúngicas tem aumentado ao longo dos anos e aquelas causadas por espécies do gênero *Candida* destacam-se entre as de maior interesse médico (STORTI *et al.*, 2012). Essas infecções são difíceis de diagnosticar e a demora no atendimento causa elevadas taxas de mortalidade. Durante anos a espécie de *Candida* mais prevalente era a espécie *C. albicans*, mas nos últimos anos esse panorama tem mudado com um aumento na incidência de *Candida* não *albicans* (HINRICHSEN *et al.*, 2009).

As espécies do gênero *Candida* ocupam o quarto lugar dentre os microrganismos mais isolados em sepse hospitalar (KUMAR *et al.*, 2015). Essas infecções causam uma grande preocupação já que são difíceis de diagnosticar. Em casos de candidemia (infecções sistêmicas), as culturas de sangue são positivas em apenas 50% dos casos (WILLE *et al.*, 2013). As infecções fúngicas podem progredir rapidamente levando a um aumento das taxas de mortalidade e custos hospitalares, devido ao aumento do tempo de hospitalização (KAZAK *et al.*, 2014).

As infecções causadas pelo gênero *Candida* ocorrem devido a fatores relacionados ao hospedeiro e a mudanças em procedimentos médicos de maneira geral (KAZAK *et al.*, 2014). Em relação ao hospedeiro, destacam-se o aumento da população imunocomprometida, presença de doenças de base e transplantados. Já em relação aos procedimentos médicos, pode-se destacar: aumento de cirurgias invasivas; uso de nutrição parenteral prolongada; uso de antibióticos de largo espectro e uso de próteses (YAPAR, 2014; NEVES-JÚNIOR *et al.*, 2015).

Atualmente existem mais de 150 espécies do gênero *Candida*, mas apenas 15 espécies já foram isoladas como agentes infecciosos (KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015). *Candida* faz parte da microbiota normal humana, sendo encontrada no sistema gastrointestinal, região vulvovaginal e também colonizando pele, cavidade oral e orofaríngea (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; YAPAR, 2014). O desequilíbrio do sistema imune do hospedeiro é a chave para o processo infeccioso (SILVA *et al.*, 2012).

Ao longo de muitos anos, *C. albicans* era a espécie mais prevalente a causar candidemia, porém esse panorama vem mudando com o aumento da incidência das espécies não *albicans* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*). Este é um fato preocupante já que a fármaco de escolha em hospitais públicos do Brasil é o fluconazol (STORTI *et al.*, 2012; YAPAR, 2014; KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015) e sabe-se

que *C. krusei* e *C. glabrata* possuem sensibilidade reduzida a este fármaco (HINRICHSEN *et al.*, 2009).

Estima-se que em 65 a 80% das infecções os microrganismos estão organizados na forma de biofilme (VALENTÍN *et al.*, 2012; BONHOMME; D'ENFERT, 2013). Biofilmes são comunidades de microrganismos organizados dentro de uma matriz extracelular que permite ao microrganismo viver em ambientes hostis bem como escapar das defesas do sistema imune do hospedeiro (GULATI; NOBILE, 2016). *Candida* spp. possui a habilidade de formar biofilmes tanto no tecido do hospedeiro quanto em dispositivos médicos (ZAVREL; WHITE, 2015; TABBENE *et al.*, 2016). Espécies de *Candida* em biofilmes exprimem uma multiplicidade de fatores que não são expressos na forma planctônica (MARTINS *et al.*, 2016). Estudar os microrganismos na forma de biofilme é tão importante quanto estudá-los na forma planctônica devido a maior prevalência do biofilme nas infecções e também devido ao fato da resistência no biofilme ser bem superior quando comparado na forma livre (YU *et al.*, 2016).

O arsenal disponível para o tratamento antifúngico é bastante reduzido em relação ao antibacteriano. Este fato é devido à dificuldade de uma fármaco que seja eficaz apenas em célula fúngica eucariótica sem possuir toxicidade para as células do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012). A escassez de fármacos antifúngicos, aliada ao problema da resistência, reforça a necessidade pela busca de novas estratégias terapêuticas, tais como, a busca por novos antifúngicos, desenvolvimento de novas formulações de fármacos e a terapia de combinação (GUO *et al.*, 2008). Falhas no tratamento podem tornar o tratamento clínico um grande desafio, aumentando os custos de saúde (SHAHID, 2016).

Na prospecção de novos agentes antifúngicos, as plantas medicinais merecem destaque por serem utilizadas amplamente na medicina popular durante séculos. Assim, esses produtos naturais podem servir como fonte de novas moléculas com propriedades antimicrobianas (PIERCE *et al.*, 2015). Neste contexto, a palmatina, que é um alcalóide isoquinolínico, que merece destaque por suas amplas propriedades biológicas, incluindo propriedades antifúngicas (MI *et al.*, 2015; DUMONT; MONARI, 2015). Palmatina possui estrutura química muito semelhante à berberina, possuindo a mesma estrutura tetracíclica, sendo encontrada em todas as plantas (*Phellodendron amurense*, *Rhizoma coptidis* e *Corydalis yanhusuo*) na qual a berberina está presente, porém em escala menor (BHADRA; KUMAR, 2011). Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou

interessante atividade da berberina frente a cepas de *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans* (DA SILVA *et al.*, 2016).

O presente estudo teve como finalidade estudar a ação antifúngica da palmatina frente a *Candida* spp. e a biofilmes utilizando o ensaio do MTT e por meio de técnicas de citometria de fluxo e teste do cometa avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na morte celular. Também foi avaliado a ação da palmatina frente a e foi realizado o ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto murino L929.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. INFECÇÕES FÚNGICAS

Atualmente, muitos avanços na medicina foram alcançados como resultados dos tratamentos para HIV, avanços em procedimentos usados em UTI, intervenções e transplante de órgãos, logo, muitas doenças não representam mais uma ameaça à vida e um aumento na expectativa de vida do paciente é possível. No entanto, junto a esse avanço veio um aumento no número de infecções oportunistas, principalmente causada por fungos. O aumento de indivíduos susceptíveis à infecções fúngicas invasivas, bolores e leveduras emergiram como agentes patogênicos. De todas as infecções fúngicas relatadas, as espécies de *Candida* são os patógenos mais prevalentes (YAPAR, 2014).

Leveduras do gênero *Candida* ocupam o quarto lugar entre os microrganismos mais frequentemente isolados em sepse hospitalar (KUMAR *et al.*, 2015). O aumento das infecções fúngicas foi bastante evidente nos últimos 30 anos (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012) e correspondem a 80% das infecções fúngicas hospitalares (COLOMBO *et al.*, 2013) e causam a morte de 12 a 60% dos paciente que desenvolvem candidemia (infecções sistêmicas) (STORTI *et al.*, 2012). Este fato trouxe uma grande preocupação, pois essas infecções são difíceis de diagnosticar, prevenir e tratar. As culturas de sangue são positivas em apenas 50% dos pacientes com candidíase invasiva e o diagnóstico é confirmado em apenas 15 a 40% dos casos (HINRICHSEN *et al.*, 2009; WILLE *et al.*, 2013).

As infecções causadas por *Candida* podem ser superficiais (afetam pele, cabelos, unhas, mucosas) ou sistêmicas envolvendo os principais órgãos do corpo (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012). A candidemia é o caso mais grave representando um grande desafio em saúde pública, pois podem progredir rapidamente levando a um aumento do tempo de hospitalização com altos índices de morbidade e mortalidade (NEVES- JÚNIOR *et al.*, 2015).

Nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade associada à candidemia é de 49%, podendo chegar a 75% em UTI neonatal (STORTI *et al.*, 2012) e no Brasil, essa taxa alcança 55,4% (WILLE *et al.*, 2013). Apesar de alguns estudos disponíveis as taxas de mortalidade associadas à candidíase na América Latina em comparação aos Estados Unidos e Europa ainda é muito pouco estudada (SANTOLAYA *et al.*, 2014).

2.2. INCIDÊNCIA DE CANDIDEMIAS

As taxas de candidemias em hospitais terciários no Brasil são bastante altas quando comparadas as taxas de países desenvolvidos, tais como, Estados Unidos, Canadá e alguns países europeus. As taxas de incidência para cada 1000 admissões, nos Estados Unidos variam de 0,28 a 0,96 e em países europeus 0,02 a 1,08. A maioria dos casos de candidemia ocorreu em UTI (WILLE *et al.*, 2013).

O primeiro estudo multicêntrico realizado no Brasil foi entre 2003 a 2004 informou alta taxa de candidemia (2,49 casos por 1000 admissões) (COLOMBO *et al.*, 2006). Essa alta taxa pode ser devido aos recursos limitados, métodos de controle de infecção insuficiente e tratamento antifúngico e profilático menos eficaz. Outro estudo realizado por Nucci *et al.* (2010) no período de 2008 a 2010 a incidência de infecções fúngicas diminuiu para 1,38 casos por 1000 admissões (YAPAR, 2014).

Bergamasco *et al.* (2013) realizaram um estudo retrospectivo incluindo 18 hospitais terciários representativos da rede pública e privada localizados em 12 cidades brasileiras nas regiões Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-oeste. O estudo considerou os pacientes com tumores sólidos e malignidades hematológicas. Dentro desse grupo *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram as espécies de não *albicans* mais frequentes.

Neves- Júnior *et al.* (2015) em um estudo feito em um hospital em Minas Gerais demonstraram que a incidência de espécies não *albicans* (56%) foi superior a *Candida albicans* (44,4%), sendo *C. tropicalis* (28%) a mais isolada. Pfaller *et al.* (2014) também verificaram um aumento de infecções fúngicas invasivas por espécies não *albicans* em um estudo constituído por 23 centros médicos nos Estados Unidos e dois no Canadá.

Um estudo realizado em dois hospitais terciários em Recife no período de 2003 a 2006 demonstrou uma incidência de *C. albicans* 28,69%, *C. tropicalis* 28,38%, *C. parapsilosis* 11,49%, *C. glabrata* 6,33%, *C. krusei* 2,34% e *C. guilliermondii* 1,09% (HINRICHSEN *et al.*, 2009). Outro estudo em um hospital terciário em Fortaleza demonstrou que espécies não *albicans* representaram 72% das espécies isoladas, sendo *C. parapsilosis* o agente mais isolado, seguido de *C. albicans* e *C. tropicalis* (MEDRANO *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que as principais espécies não *albicans* isoladas em hospitais no Brasil são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Já nos Estados Unidos e Europa a principal é *C. glabrata* em infecção invasivas (STORTI *et al.*, 2012; WILLE *et al.*, 2013).

É importante salientar que a incidência das espécies de *Candida* varia de acordo com a região geográfica e com o grupo de pacientes. Diferentes países possuem diretrizes distintas em relação às práticas médicas, por exemplo, utilização de catéteres, agentes antifúngicos e antibacterianos, recursos disponíveis para diagnóstico e cuidados médicos. Já os grupos de pacientes estudados diferem em relação à idade, sexo e presença de comorbidades. Existe uma grande variação entre os estudos já que estes, em geral, são realizados em hospitais que predominam um grupo de pacientes com doenças de base semelhantes e também existem procedimentos que são padrões dentro da instituição hospitalar estudada. Por isso estudos locais podem representar taxas de incidência maior do que os multicêntricos. A maioria dos estudos multicêntricos de infecções fúngicas invasivas são originários da América do Norte. Os estudos europeus e outras regiões do mundo incluem dados de centros individuais. Nesses estudos, são analisados grupos de pacientes (internados na UTI, com doenças hematológicas malignas, transplantados, recém-nascidos ou geriátricos) (YAPAR, 2014; PFALLER *et al.*, 2014).

2.3. GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* possui mais de 150 espécies na natureza, porém apenas 15 delas são patogênicas ao homem (YAPAR, 2014). Estas são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* e *Candida norvegensis*. Dentre essas 15 espécies patogênicas, cerca de 95% das infecções são causadas por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015).

Durante muitos anos, a espécie líder em candidemias era *Candida albicans*, no entanto, as espécies chamadas de *Candida* não *albicans* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*) vem emergindo como importantes agentes patogênicos. O aumento dessas espécies como patógenos humanos pode ser atribuída à melhoria nos métodos de identificação laboratorial e aumento do uso profilático e empírico de antifúngicos azólicos (HINRICHSEN *et al.*, 2009).

A mudança no padrão da incidência de espécies não *albicans* em candidemias revela a importância da correta identificação laboratorial para que o tratamento seja efetivo e para

que se possa ter um melhor entendimento do perfil epidemiológico dessas infecções. O aumento de candidemia por espécies não *albicans* é muito preocupante, pois torna o tratamento mais caro e difícil, com prognóstico impreciso. Sabe-se que *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol. O tratamento de escolha para candidemias em hospitais públicos no Brasil é o fluconazol (STORTI *et al.*, 2012; YAPAR, 2014; KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015).

2.3.1. Principais espécies de *Candida*

Candida parapsilosis é responsável por 15 a 30% das candidemias no Brasil, sendo uma das espécies mais prevalentes na América latina. Relata-se que *C. parapsilosis* é um agente que afeta principalmente recém nascidos ou pacientes internados em UTI que fazem uso de catéter venoso. Isto pode estar relacionado com insuficientes métodos de manutenção do cateter e controle dos métodos de infecção. *C. parapsilosis* também é bastante comum em unidades pediátricas e neonatais ocorrendo contaminação exógena devido à manipulação dos pacientes pela equipe médica (YAPAR, 2014). Essa espécie cresce em solução de glicose e tem capacidade de produzir biofilme, sendo relatada em surtos associados ao uso de cateter venoso central e nutrição parenteral (COLOMBO *et al.*, 2013). A candidemia em crianças e neonatos é bastante preocupante já que pode causar problemas no desenvolvimento neurológico de pacientes com menos de 18 meses (KUMAR *et al.*, 2015).

C. tropicalis apresenta-se como importante causa de fungemia em pacientes oncológicos, com diabetes, leucemia, neutropênicos, que fazem uso de cateteres venosos e que tomam antibióticos de amplo espectro. Essa maior proporção de *C. tropicalis* em adultos internados em unidades de oncologia/ hematologia pode ser explicada pelo uso empírico e profilático de antifúngicos. Esta espécie é a segunda ou terceira principal em pacientes com câncer, particularmente com leucemia sendo menos frequente em pacientes com tumores sólidos (HINRICHSEN *et al.*, 2009; COLOMBO *et al.*, 2013; YAPAR, 2014).

Candida krusei é um agente patogênico ocasional sendo particularmente isolada de pacientes com malignidades hematológicas ou que passaram por transplante de células tronco hematopoéticas. Essa levedura é mais isolada em pacientes que fizeram uso profilático de fluconazol, isso pode ser explicado por uma possível pressão seletiva favorecendo essa espécie já que ela é pouco sensível ao fluconazol (COLOMBO *et al.*, 2013; YAPAR, 2014).

C. glabrata emergiu como um importante agente patogênico hospitalar, representando a segunda ou terceira espécie mais comum em candidemia em centros médicos nos Estados Unidos e Europa. É mais comum entre os pacientes idosos e oncológicos (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2013).

2.4. PATOGENIA

Espécies do gênero *Candida* colonizam as membranas logo após o nascimento, fazendo parte da microbiota normal do sistema gastrointestinal (KAZAK *et al.*, 2014). Também colonizam a pele, cavidade oral, orofarínge, trato respiratório inferior, geniturinário e vulvovaginal. Podem ser encontrados em cerca de 25 a 75% de indivíduos saudáveis como microrganismo comensal, sem causar nenhum dano ou inflamação do tecido (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; YAPAR, 2014).

Alterações no hospedeiro são necessárias para a levedura passar de microrganismo comensal inofensiva para uma levedura patogênica potencialmente fatal (SILVA *et al.*, 2012). Quando há falhas no sistema imune do hospedeiro o número de *Candida* pode aumentar no trato gastrointestinal e as leveduras podem entrar na corrente sanguínea quando há comprometimento das barreiras secundárias, tais como queimaduras ou após procedimentos médicos invasivos causando candidemia (COLOMBO *et al.*, 2013, KAZAK *et al.*, 2014).

O desenvolvimento da candidemia pode ser relacionado a dois grupos de fatores de risco, um deles relacionados ao hospedeiro e o outro relacionado aos cuidados de saúde. Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro destacam-se: idade avançada; presença de doenças de base (câncer, insuficiência renal, doença pulmonar, diabetes mellitus, doença cardíaca); aumento da população imunocomprometida; neutropenia; pacientes transplantados. Em relação aos cuidados médicos tem-se: número elevado de procedimentos médicos invasivos; uso prolongado de catéter; nutrição parenteral; intervenções cirúrgicas; ventilação mecânica; uso de antibióticos de largo espectro e quimioterapia (SILVA *et al.*, 2012; WILLE *et al.*, 2013; YAPAR, 2014; NEVES-JÚNIOR *et al.*, 2015). Pacientes com grandes queimaduras também podem constituir um grupo altamente vulnerável ao desenvolvimento de infecções invasivas por *Candida*. Isso ocorre devido a grandes áreas lesadas, lesão térmica e longa permanência na UTI (FOCHTMANN *et al.*, 2015).

Em ambiente hospitalar, as infecções fúngicas podem se originar de cepas endógenas (oriundas do próprio paciente) ou exógenas (adquiridas por soluções contaminadas, dispositivos biomédicos ou mãos de profissionais de saúde) (STORTI *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Al-Rawahi ; Roscoe (2013) em um centro terciário no Canadá analisou os principais fatores de risco associado ao desenvolvimento de candidemia. No total foram incluídos no estudo 266 episódios de candidemia e os fatores de risco mais relatados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Principais fatores de risco associados à candidemia em um hospital terciário do Canadá.

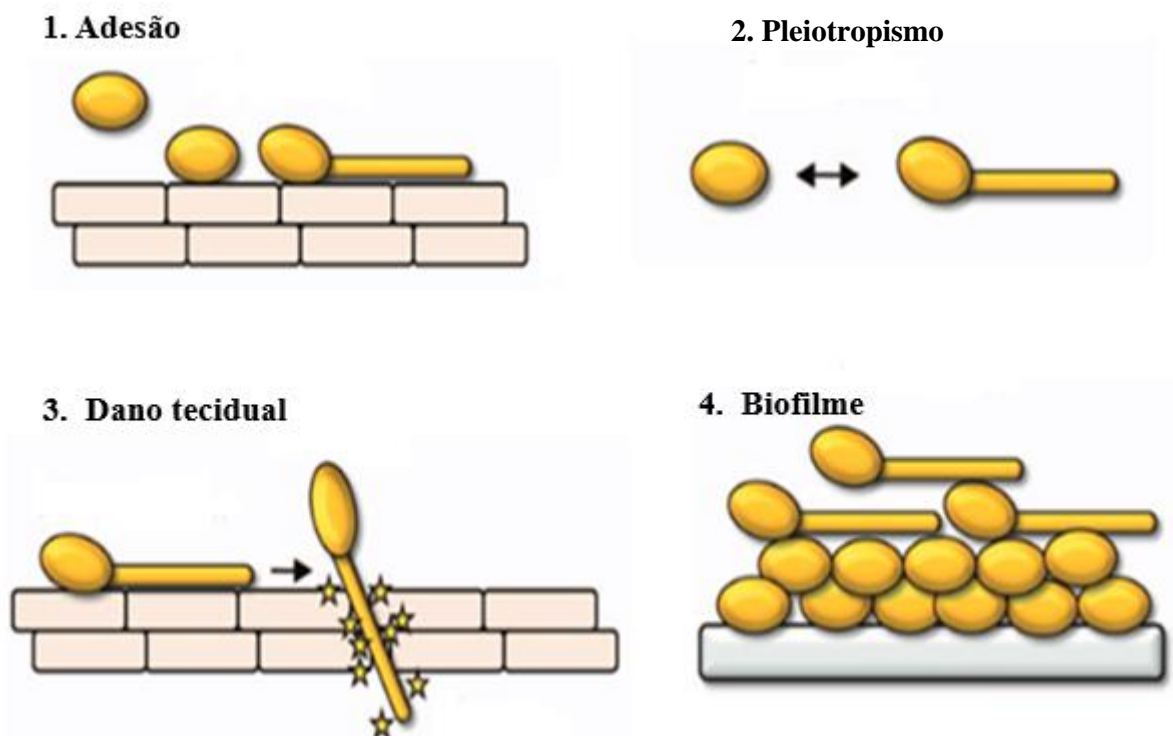
Fatores de risco para pacientes com candidemia (n=266)	
Fator de risco	n (%)
Catéter venoso central	192 (72)
Nutrição parenteral total	77 (29)
Terapia antifúngica	36 (14)
Terapia antibiótica	227 (85)
Malignidades	90 (34)
Neutropenia	31 (12)
Transplantes	29 (11)
Terapia imunodepressora	37 (14)
Terapia com esteróides	44 (17)
Admissão em UTI	101 (38)
Queimaduras	7 (3)
Diálise	19 (7)
Cirurgia pélvica e abdominal	83 (31)
Outros procedimentos*	18 (7)

* Colonoscopia, biópsia de bexiga, stent de uretra, lipotripsia, dentre outros. Fonte: AL-RAWAHI; ROSCOE, 2013.

2.5. PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogenicidade das espécies de *Candida* é mediada pela presença de alguns fatores de virulência (Figura 1), destacando-se a adesão, produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas), formação de biofilme no hospedeiro e em dispositivos médicos e mudança de morfologia. A combinação desses fatores de virulência produzidos pelo microrganismo juntamente a falhas no sistema imunológico do hospedeiro levam ao estabelecimento da doença (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; LIM *et al.*, 2012).

Figura 1- Alguns fatores de virulência em *Candida*.



1) Adesão tanto nas células do hospedeiro quanto em superfície abiótica; 2) Pleiotropismo que é a capacidade de mudar a estrutura morfológica de levedura para hifa; 3) Dano tecidual quando na forma de hifa, ajudando na invasão tecidual; 4) Formação de biofilme pelo agrupamento de células com diferentes morfologias

Fonte: Adaptado de Mayer; Wilson; Hube, 2013.

2.5.1. Aderência

A adesão é uma etapa necessária para a colonização inicial sendo mediada por adesinas. A aderência permite a permanência do microrganismo no hospedeiro e é considerado essencial para o estabelecimento da doença (SILVA *et al.*, 2012). Adesinas (polissacarídeos, glicoproteínas e lipídeos) são biomoléculas que promovem a aderência do microrganismo nas células do hospedeiro possibilitando assim a invasão tecidual (LIM *et al.*, 2012).

2.5.2. Enzimas degradativas secretadas

A destruição de tecidos do hospedeiro pode ser facilitada pela produção de enzimas hidrolíticas, tais como, aspartil proteinases, fosfolipases, lipases e hemolisinas. A invasão e colonização são facilitadas pela ruptura de membranas e degradação de proteínas do sistema de defesa do hospedeiro. Fosfolipases são enzimas que degradam ácidos graxos promovendo

dano celular, o que também pode agir facilitando a exposição de receptores responsáveis por facilitar a adesão (SILVA *et al.*, 2012). Estudos demonstram a presença de fosfolipase nas hifas durante a invasão tecidual. Os genes responsáveis pela produção de aspartil proteinase são expressos diferentemente durante as fases da infecção (LIM *et al.*, 2012).

2.5.3. Mudança morfológica

C. albicans é um fungo polimórfico que é capaz de mudar a sua morfologia de levedura para hifa. Este processo é importante na invasão tecidual já que as hifas podem promover dano tecidual por ação mecânica. *Candida* na forma filamentosa possui maior resistência a fagocitose comparado a forma de levedura (SILVA *et al.*, 2012). A vantagem da forma de levedura está relacionada à melhor disseminação na corrente sanguínea. Essas mudanças morfológicas são estimuladas por sinais ambientais (LIM *et al.*, 2012). Nesse processo é importante a sinalização denominada *quorum sensing* que permite o controle populacional e mudanças morfológicas. Uma importante molécula nesse processo é denominada de farnesol, essa molécula quando a densidade celular é elevada ($> 10^7$ células/mL) promovem o crescimento na forma de levedura, enquanto quando existe uma baixa densidade celular ($< 10^7$ células/mL) favorece a formação de hifas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; LIM *et al.*, 2012).

2.6. BIOFILME

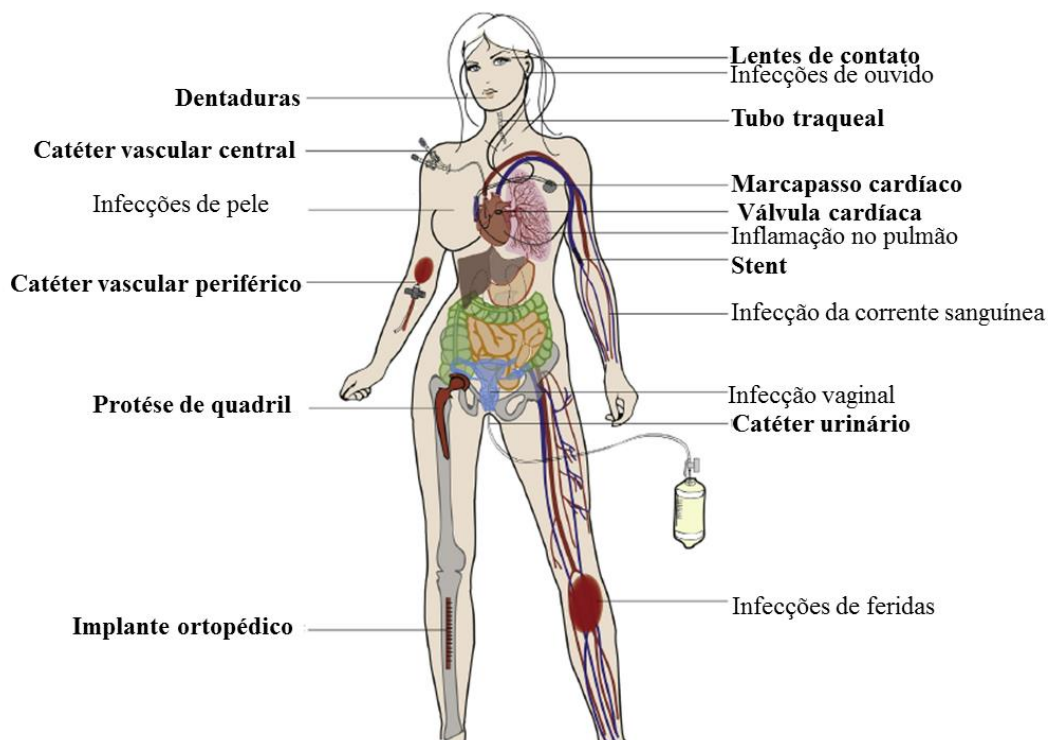
2.6.1. Características gerais

Nas últimas duas décadas, as pesquisas científicas vêm dando maior destaque a estudar os biofilmes já que esta é a forma natural em que a maioria dos microrganismos é encontrada. O primeiro relato científico sobre biofilme foi em 1638 descrito por Antonie Van Leeuwenhoek em um artigo para a Sociedade Real de Londres. Ele descreve sua observação sobre placa dentária: “O número de animalículos na superfície de um dente são tantos que eu acredito excederem o número de homens em um reino” (GULATI; NOBILE, 2016).

A maioria das espécies de *Candida* pode formar biofilme no tecido do hospedeiro e dispositivos médicos, tais como válvulas cardíacas protéticas, catéter venoso central, próteses

articulares, catéter urinários, dentre outros (Figura 2) (VALENTÍN *et al.*, 2012; KAZAK *et al.*, 2014; ZAVREL; WHITE, 2015; TABBENE *et al.*, 2016).

Figura 2- Áreas esquemáticas do corpo feminino susceptível a infecção por *Candida albicans*.



As infecções ocorrem por um dispositivo médico diretamente colonizado por um biofilme (negrito) ou a partir de uma infecção localizada ou disseminada. Fonte: Gulati; Nobile, 2016.

A formação de biofilme em superfícies abióticas torna-se um problema grave, já que muitas vezes a retirada do implante é necessária para que a infecção seja controlada. No entanto, a retirada de catéteres possui alto risco para o paciente levando em alguns casos a trombocitopenia, coagulopatias e falta de acesso venoso alternativo (RANE *et al.*, 2014). *Candida tropicalis* também podem crescer em soluções ricas em glicose e lipídeos. Este fato pode estar associado à alta prevalência desse microrganismo em pacientes que recebem nutrição parenteral (SILVA *et al.*, 2012).

Nos Estados Unidos, mais de cinco milhões de catéteres venosos centrais são colocados anualmente e apesar de melhorias clínicas, infecções e biofilme ocorrem em mais de 50% destes catéteres. Estima-se 100 000 mortes e uma despesa de US\$ 6,5 bilhões, trazendo graves consequências tanto econômicas quanto para a saúde (GULATI; NOBILE, 2016).

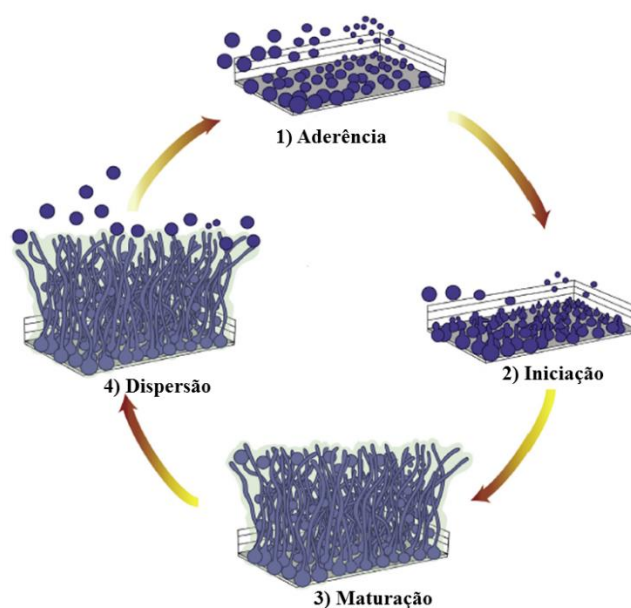
Estima-se que 65 a 80% das infecções os microrganismos estão organizados na forma de biofilme, levando ao estabelecimento de doenças crônicas com alta taxa de

mortalidade (VALENTÍN *et al.*, 2012; BONHOMME; D'ENFERT, 2013). *Candida* em biofilmes possui uma multiplicidade de fatores que não são expressos em *Candida* na forma planctônica (MARTINS *et al.*, 2016). A formação do biofilme é um importante fator de virulência, pois permite aos microrganismos viverem em ambientes hostis, conferindo maior resistência à terapia antifúngica e protegendo as células fúngicas do sistema imune do hospedeiro (YU *et al.*, 2016).

2.6.2. Etapas da formação do biofilme

O processo de formação do biofilme é um processo complexo baseado em algumas etapas que abrangem a adesão, formação de colônias, proliferação e diferenciação, secreção de matriz extracelular, maturação e dispersão (Figura 3).

Figura 3- Ciclo de vida do biofilme de *Candida albicans*.



1) Aderência das células a superfície; 2) Iniciação da formação do biofilme, onde as células proliferam para formar uma camada basal de células aderentes; 3) Maturação do biofilme, onde existem células de diferentes morfologias envolta em uma matriz extracelular; 4) Dispersão, em que as células na forma de leveduras saem do biofilme para aderir em novos locais. Fonte: Gulati; Nobile, 2016.

A etapa inicial é a adesão à superfície influenciada por fatores abióticos como hidrofobicidade e fatores bióticos, como o aumento da produção de adesinas e outras

proteínas de superfície. Portanto, a inibição da adesão em espécies de *Candida* é um alvo promissor para interromper o estágio inicial da formação do biofilme. Sabe-se que o processo de adesão inicia-se entre 60 a 90 min após o contato a superfície. Após a adesão, as leveduras transformam-se em hifas, contribuindo para a estabilidade da arquitetura do biofilme e agindo como suporte. Desta forma, a capacidade de formar hifas bem como a capacidade de aderir uma as outras é fundamental para o desenvolvimento e manutenção do biofilme (BONHOMME; D'ENFERT, 2013).

Em seguida tem-se: a formação de colônias; secreção de matriz extracelular; maturação em uma estrutura tridimensional e dispersão celular (BONHOMME; D'ENFERT, 2013). A matriz extracelular de diferentes espécies de *Candida* possui composição diferenciada. Em *C. albicans* é composta de glicoproteínas (55%), hidrocarbonatos (25%), lipídeos (15%) e ácidos nucléicos (5%). O biofilme maduro forma-se após 24 h, podendo ser visualizado a olho nu como uma estrutura opaca e sob microscópio, como um conjunto de células com estruturas diferentes (levedura, pseudo-hifa e hifa) (GULATI; NOBILE, 2016).

No processo de dispersão apesar das células dispersas serem morfologicamente semelhantes a leveduras, elas apresentam características distintas das leveduras em sua forma planctônica de crescimento. Leveduras dispersas do biofilme possuem maior aderência e maior capacidade de formar biofilmes (GULATI; NOBILE, 2016). A literatura evidencia que mutações que favorecem células filamentosas sobre as células de formato de levedura podem reduzir dispersão do biofilme. Logo, a capacidade das células passarem de levedura para hifas são críticos, não apenas na formação do biofilme, como também na manutenção e dispersão.

2.6.3. Resistência antifúngica em biofilmes

Biofilmes costumam apresentar uma alta tolerância aos antifúngicos e este processo é multifatorial. Alguns estudos sugerem um papel importante da matriz extracelular nesse processo. A matriz ajuda a preservar a integridade da arquitetura do biofilme e age sequestrando fármacos, impedindo assim, o acesso delas as células do biofilme e evitando o desencadeamento de respostas celulares. Porém, estudos demonstram que a resistência aos antifúngicos inicia-se muito rapidamente logo após a adesão. Outros fatores também merecem destaque: crescimento celular lento dentro do biofilme; ativação de genes de bombas de efluxo (CDR, MDR); alterações na concentração de esterol; alta densidade celular dentro do biofilme; presença de células persistentes e diferentes padrões de expressão gênica.

Biofilmes são difíceis de erradicar representando focos contínuos de infecção (VALENTÍN *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016).

Valentín *et al.* (2012) demonstraram que azóis, incluindo voriconazol, não possuem atividade contra biofilme pré-formado de *Candida* spp. Essa resistência pode ser explicada pela alta expressão de bombas de efluxo nas fases iniciais da formação do biofilme e por baixos níveis de ergosterol na fase intermediária e madura. Entretanto, um estudo demonstrou que fluconazol e caspofungina pode evitar a formação do biofilme quando a superfície em que é formado é previamente tratada com esse fármaco ou quando o biofilme é formado na presença dessas fármacos.

Biofilme de *C. albicans* possuem ambiente heterogêneo com vários tipos celulares (hifas, pseudo-hifas e leveduras). Estudos revelam que é importante para a formação de um biofilme eficiente um ambiente de hipóxia. Células em biofilme demonstram elevada expressão de genes envolvidos na glicólise, metabolismo de ácidos graxos e síntese de ergosterol (BONHOMME; D'ENFERT, 2013). É interessante o fato que pode haver competição entre diferentes espécies de *Candida* na formação do biofilme. De acordo com Barros *et al.* (2016), *C. krusei* e *C. glabrata* são capazes de alterar e inibir a adesão e formação de biofilme em espécie de *C. albicans*, sugerindo uma interação competitiva entre essas espécies.

2.6.4. Quorum-sensing

Quorum sensing (QS) é um conjunto de sinais químicos que permitem a regulação de variados processos dentro do biofilme. Esses sinais permitem a regulação da expressão gênica em resposta a flutuações na densidade celular (YU *et al.*, 2012, AL-RAWAHI; ROSCOE, 2013). QS é mediada por autoindutores que são moléculas de sinalização exógena. Essas moléculas acumulam-se durante o crescimento celular e após atingir uma determinada concentração limite, induzem alterações na expressão de genes relacionados à virulência, morfologia das células, crescimento, formação do biofilme, resistência ao stress oxidativo, dentre outras (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Durante a infecção, a liberação de fatores de virulência de forma coordenada em microrganismos patogênicos é importante para o estabelecimento da doença e confere proteção contra o sistema imune do hospedeiro. Algumas substâncias do QS são consideradas

fatores de virulência por si mesmos, já que podem ser tóxicos para as células hospedeiras (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012).

Farnesol e tirosol são duas moléculas do quorum sensing que atuam de forma inversa na formação do biofilme (PIERCE *et al.*, 2015). Farnesol em *C. albicans* age como uma molécula autorreguladora inibindo o crescimento de hifas e a expressão de genes específicos necessários para a formação de um biofilme eficaz. Já o tirosol age estimulando a filamentação. Vários estágios de desenvolvimento do biofilme são influenciados pelo farnesol incluindo a adesão das células a superfície, arquitetura de biofilmes maduros e a dispersão de células do biofilme (DEVEAU; HOGAN, 2011; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). Farnesol e seus derivados são precursores da síntese do ergosterol e possui papel na resistência antifúngica do biofilme. Estudos demonstram que somente biofilmes com alta densidade celular apresentam resistência a antifúngicos (YU *et al.*, 2012).

O entendimento de como essas moléculas de QS age é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, podendo levar ao surgimento de fármacos menos tóxicos que atuem enfraquecendo ou inibindo a formação de biofilmes (DEVEAU; HOGAN, 2011; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012).

2.7 ANTIFÚNGICOS

Muitos hospitais realizam o tratamento empírico e profilático de pacientes que possuem fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de candidíase invasiva. Tais como, aqueles pacientes que sofreram cirurgia abdominal recente, perfurações gastrointestinais ou anastomoses. Pacientes que possuem fatores de risco, mas que não passaram por nenhum procedimento invasivo, a profilaxia antifúngica não é aconselhável. Já que o risco de resistência antifúngica é alto (MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOLOPOULOS, 2015).

Em geral, microrganismos sensíveis respondem em 90% dos casos quando se usa terapia antifúngica adequada e 60% em casos de microrganismos resistentes. Essa é conhecida como regra 90 a 60 e vem sendo aplicada desde 1960 até hoje. A interação entre fármaco e microrganismo depende de vários fatores, tais como, a espécie do agente patogênico, a cepa, sensibilidade, forma de crescimento, dose do fármaco e local da infecção. Sabe-se que os antifúngicos são mais eficientes em células com crescimento ativo do que em células quiescentes (ZAVREL; WHITE, 2015).

O arsenal antifúngico disponível comparado com o antibacteriano é bastante limitado. Isto pode ser atribuído à dificuldade de descobrir um fármaco que seja eficaz apenas em célula fúngica eucariótica sem possuir toxicidade para as células do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012). Os antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíase incluem os poliênicos (anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipossomal), triazólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol) e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) (MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOLOPOULOS, 2015).

Anfotericina B representa uma boa opção terapêutica, pois possui largo espectro e baixo custo, mas possui a desvantagem de causar nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e anemia. Este fármaco interage com o ergosterol presente na membrana fúngica formando poros, através destes ocorre perda de importantes componentes celulares levando a célula fúngica à morte (MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOLOPOULOS, 2015). Logo, ela é usada com cautela principalmente em microrganismos resistentes a azólicos e equinocandinas. O seu uso pode prolongar a permanência do paciente no hospital devido a sua toxicidade (STORTI *et al.*, 2012). Na tentativa de reduzir os efeitos colaterais da anfotericina B (ANFO B desoxicolato ou convencional) foi desenvolvido uma formulação lipídica (dispersão lipossomal) que possui menor toxicidade e melhor tolerabilidade, mas o custo desta formulação é bem superior em relação a convencional (COLOMBO *et al.*, 2013).

Antifúngicos azólicos possuem amplo espectro de ação e podem ser divididos em duas classes: imidazólicos e triazólicos. O primeiro imidazólico de ação tópica, clotrimazol, foi lançado em 1960 e ainda é usado para candidíase superficial. Os triazólicos são divididos em primeira geração (itraconazol e fluconazol) e de segunda geração (voriconazol e posaconazol). Os azólicos agem inibindo a enzima lanosterol-14- α -desmetilase, enzima chave no processo de produção do ergosterol. Sem essa enzima o ergosterol não é formado e a célula fúngica tem sua membrana enfraquecida (SILVA *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2013).

O tratamento de escolha para candidemias em hospitais públicos no Brasil é o fluconazol (STORTI *et al.*, 2012). Fluconazol tem atividade contra dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp. exceto *C. krusei* que possui resistência primária e *C. glabrata* que possui menor sensibilidade, principalmente em pacientes com exposição prévia a esse antifúngico. Fluconazol possui ação tanto em candidíase superficial quanto em candidíase sistêmica. Em casos de *C. krusei* e *C. glabrata* os azólicos usados são o voriconazol e posaconazol (COLOMBO *et al.*, 2013).

Equinocandinas constituem uma nova classe de medicamentos antifúngicos para candidíase invasiva. Possui três representantes: caspofungina, micafungina e anidulafungina. Essa classe apresenta maior segurança e menos efeitos secundários, já que agem em uma estrutura exclusivamente presente na célula fúngica.

É útil em casos de exposição prévia a azólicos, bem como em casos de resistência (STORTI *et al.*, 2012). Age inibindo a enzima 1,3- β -D-glucano-sintase que sintetiza a 1,3- β -D-glucano um componente essencial na parede celular fúngica.

Na América latina, a anfotericina B desoxicolato permanece sendo o fármaco mais utilizada, seguida por fluconazol. Equinocandinas e formulações lipossomais de anfotericina B são pouco utilizadas devido ao elevado custo (SIFUENTES- OSORNIO *et al.*, 2012).

Recentemente as diretrizes da ESCMID (Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas) sugerem no caso de candidemias o uso inicial de equinocandinas, especialmente em pacientes instáveis. Bem como, a retirada de catéteres venosos centrais ou dispositivos implantados (MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOLOPOULOS, 2015).

2.8. RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

O aumento da taxa de isolamento de espécies não *albicans* traz uma alerta a necessidade da correta identificação das espécies para que a terapêutica escolhida seja mais segura e eficaz (KUMAR *et al.*, 2015). A resistência a fármacos antifúngicos é um fenômeno cada vez mais recente e pode ser definida como a persistência clínica de sinais e sintomas da infecção apesar de um nível tolerável do fármaco (SILVA *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015).

O início de programas de vigilância de sensibilidade aos antifúngicos emergiu em todo mundo após um caso de um paciente com HIV e candidíase orofaríngea que não respondeu ao tratamento com fluconazol (CASTELO- BRANCO *et al.*, 2013).

Existem dois tipos de resistência dependendo do fármaco e da espécie de *Candida*, podendo ser inerente, ou seja, aquela que está presente sem exposição prévia ao antifúngico ou a resistência pode ser adquirida, na qual ocorre um desenvolvimento da resistência em um microrganismo sensível após certo período de exposição ao agente (SILVA *et al.*, 2012).

Fluconazol é a primeira opção tanto no tratamento como na prevenção de infecções fúngicas devido a seu baixo custo e poucos efeitos colaterais. Entretanto, seu uso indiscriminado levou a muitos casos de resistência. O mecanismo mais comum de resistência

a azólicos ocorre através da expressão de transportadores proteicos de membrana (bombas de efluxo) que reduzem o nível intracelular da fármaco.

Genes CDR (*candida drug resistance*) codificam transportadores ABC que promovem a resistência a vários azólicos, já o gene MDR (*multidrug resistance*) codifica a superfamília do transportador principal (MFS) que leva a resistência específica ao fluconazol e não parece está relacionado a resistência cruzada. Membros da família ABC utilizam a energia da hidrólise do ATP para transporte ativo de fármacos, já a superfamília MFS usa energia proveniente de gradiente de prótons (NEVES- JÚNIOR *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Além da superexpressão de bombas de efluxo, mutações no gene ERG11 podem ser responsáveis por alterações tridimensionais da enzima lanosterol 14- desmetilase, alterando a afinidade desta enzima por azólicos reduzindo assim a biossíntese do ergosterol. Outro mecanismo de resistência é a produção exagerada da enzima alvo, devido ao aumento da expressão do gene ERG11 (GONÇALVES *et al.*, 2016).

A resistência a fármacos azólicos é um grande problema clínico e também ambiental, já que fármacos antifúngicos são usadas para erradicação e prevenção de doenças na agricultura (ZAVREL; WHITE, 2015). Um estudo realizado em Fortaleza encontrou a presença de uma cepa de *Candida* com alta resistência a fluconazol, itraconazol e voriconazol em um porco espinho. O fato de o animal ser herbívoro explica a presença de cepa com tão alta resistência aos azólicos. Outra hipótese seria a exposição a contaminantes ambientais que são eliminados por bombas de efluxo não específicas. Essas bombas respondem a presença de vários contaminantes ambientais ou compostos químicos, tais como, metais pesados, antibacterianos e fármacos citotóxicos conduzindo a regulação positiva de proteínas transmembranas (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2013).

2.9. NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

Desenvolver um medicamento novo é um processo longo, difícil e muito dispendioso, estimado em 15 anos e um investimento em torno de 1,5 bilhão de dólares. Além disso, a taxa de sucesso global é extremamente baixa e fármacos novos devem passar por um exigente processo de aprovação das agências regulatórias (PIERCE *et al.*, 2015).

Devido ao aumento das infecções fúngicas juntamente com o baixo número de fármacos antifúngicos disponíveis, faz-se necessário à busca por novas estratégias

terapêuticas de tratamento dessas infecções. Nesse contexto, vale salientar também o aumento da resistência aos antifúngicos que torna o tratamento clínico um grande desafio. Falhas no tratamento causam altas taxas de mortalidade e aumento nos custos de saúde (SHAHID, 2016).

Devido à resistência antifúngica buscam-se outras estratégias terapêuticas, tais como: busca por novos antifúngicos, desenvolvimento de novas formulações de fármacos já existentes; melhorar a terapia antifúngica com o uso da combinação de fármacos, que possuem diferentes mecanismos de ação e fazer o uso combinado de antifúngicos com fármacos que fazem parte de outras classes terapêuticas (GUO *et al.*, 2008). Assim, dar um novo olhar a antigos fármacos bem como aqueles com outras indicações terapêuticas vem ganhando força como um importante caminho alternativo para acelerar o desenvolvimento de novos medicamentos (PIERCE *et al.*, 2015).

Uma área importante que está em evolução é a identificação de fármacos que apresentem efeito sinérgico quando usada juntamente com azólicos. Muitas dessas substâncias já são aprovados para tratamentos de outras doenças, mas a sua combinação com azólicos pode aumentar a potência do azólico ou retardar o surgimento de resistência ao azólico (ZAVREL; WHITE, 2015). Nesse contexto, pode-se citar um trabalho em que o uso da amiodarona, medicamento pertencente à classe de antiarrítmicos, quando combinada ao fluconazol apresenta interessante atividade antifúngica em espécies de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol (DA SILVA *et al.*, 2013). Oliveira *et al.* (2014) também demonstraram a atividade da fluoxetina sozinha e em combinação com o fluconazol em cepas de *Candida* isoladas de candidíase vaginal. A combinação de fármacos resultou em efeito sinérgico em algumas cepas do estudo (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Plantas e outros produtos naturais têm sido utilizados extensivamente na medicina popular durante séculos e são geralmente consideradas boas escolhas para uma vasta variedade de doenças (PIERCE *et al.*, 2015). Os produtos naturais podem servir como fonte na prospecção de novas agentes antifúngicos.

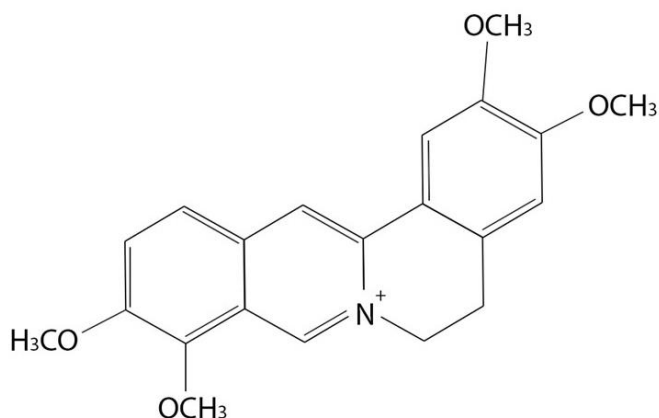
2.10. PALMATINA

Os alcalóides constituem um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas, geralmente de origem vegetal. Estas substâncias vêm sendo estudadas com maior atenção devido ao seu potencial terapêutico (MI *et al.*, 2015). *Radix berberidis*, *Rhizoma coptidis* e

Cortex phellodendri são comumente usados na medicina tradicional chinesa por conter alcalóides isoquinolínico, e eles têm sido aplicados por mais de 2.000 anos em virtude dos efeitos anti-infecciosos (QI *et al.*, 2013). Além da China, a população de países como Índia, Japão, Tailândia e África costumam usar plantas medicinais contra doenças infecciosas e não infecciosas (JIA *et al.*, 2010).

Dentre os alcalóides, a palmatina (Figura 4) merece destaque, pois há muitos anos está sendo utilizada na medicina tradicional (BHADRA; MAITI; KUMAR, 2008; BHADRA; KUMAR, 2011). Palmatina é um dos principais alcalóides protoberberina encontrado em plantas medicinais possuindo várias propriedades biológicas, sendo usada no tratamento da icterícia, disenteria, hipertensão, inflamação e doenças relacionadas com o fígado (MI *et al.*, 2015; DUMONT; MONARI, 2015).

Figura 4- Estrutura química da palmatina



Fonte: Bhadra, Maiti, Kumar, 2007.

Palmatina é um análogo estruturalmente semelhante a berberina possuindo a mesma estrutura tetracíclica diferindo apenas nos substituintes do anel benzênico, sendo metilenoedioxi para a berberina e dimetoxi para a palmatina. Palmatina é encontrada em todas as espécies de plantas onde a berberina está presente, entretanto, palmatina é encontrada em escala muito menor (BHADRA; KUMAR, 2011).

Um estudo demonstrou a ação da palmatina como potente inibidor da acetilcolinesterase sendo utilizada com segurança para melhorar a memória. Esse uso já havia sido observado na medicina popular da China, onde a população costuma tomar chás para essa finalidade (MAK *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstram a ação da palmatina contra o câncer em linhagens HL-60 leucêmicas possivelmente devido à inibição das enzimas transcriptase reversa e

topoisomerase I e II (ZHANG *et al.*, 2012; BHADRA; KUMAR, 2011; ISLAM *et al.*, 2008). Hambright *et al.* (2014) demonstraram que a palmatina inibe seletivamente o crescimento de células cancerígenas de próstata, sem efeitos significativos em células não cancerígenas. Zhang *et al.* (2012) estudaram derivados da palmatina no câncer, demonstrando que o aumento de grupos alquila na cadeia carbônica pode melhorar a atividade antitumoral. Essa mudança deixa os compostos mais lipofílicos, aumentando a sua permeabilidade na membrana celular.

Na microbiologia, os alcalóides isoquinolínicos possuem atividade antimicrobiana significativa contra uma variedade de microrganismos incluindo bactérias, vírus, fungos, protozoários, helmintos e clamídias (MI *et al.*, 2015). Palmatina também possui atividade contra leishmaniose cutânea, inibindo o crescimento de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (NKWENGOUA *et al.*, 2009). Xiao *et al.* (2015) demonstraram que palmatina possui ação contra o fungo dermatófito *Microsporum canis* em dermatite induzida em coelhos (XIAO *et al.*, 2015). Deng, Zhang, Luo (2012) testaram a atividade antimicrobiana da palmatina contra 12 bactérias patogênicas incluindo Gram positivas (*Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*) apresentando concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 100 a 1000 µg/ mL. Jia *et al.* (2010) sugerem que palmatina pode ser usada contra o vírus do Nilo Ocidental bem como contra outros flavivírus, tais como, o vírus da dengue e febre amarela de maneira dose dependente.

Park *et al.* (1999) demonstrou a atividade antifúngica da palmatina contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, apresentando CIM maior que 500 µg/ mL para todas as espécies com exceção de *C. parapsilosis* que apresentou CIM igual a 15,6 µg/ mL. Esses autores sugerem que a atividade antifúngica da palmatina é devido a habilidade de inibir a enzima esterol 24- metil transferase (24-SMT) e quitina sintase, enzimas chaves em vias de biossíntese do ergosterol e quitina (SLOBODNIKOVA *et al.*, 2004).

2.10.1. Interação entre Palmatina e DNA

A grande maioria das moléculas planas aromáticas podem se ligar ao DNA por intercalação, ou seja, inserem-se entre os pares de bases exercendo a sua atividade biológica (BHADRA; MAITI; KUMAR, 2007). Palmatina, assim como seu análogo estrutural berberina, liga-se ao DNA por intercalação exibindo especificidade pelas bases adenina (A) e timina (T) (ISLAM et al., 2008). Porém, palmatina liga-se mais fortemente ao DNA conseguindo intercalar-se mais profundamente na sua estrutura helicoidal (BHADRA; KUMAR, 2011). A interação entre palmatina e o material genético celular, permite que a palmatina pode ser utilizada na pesquisa como marcador fluorescente de ligação ao DNA e RNA devido ao seu alto poder de ligação (MI et al., 2015).

Recentemente, tem havido um maior interesse em busca da compreensão de como moléculas ativas ligam-se ao material genético das células. Esse conhecimento leva a uma melhora no desenvolvimento de quimioterápicos mais eficazes e com menor toxicidade podendo ser direcionados a sequência específicas do DNA ou RNA (BHADRA; KUMAR, 2011).

3. HIPÓTESES

Palmatina vem sendo utilizada na medicina popular há muitos anos apresentando várias propriedades terapêuticas. Vários estudos demonstram as suas propriedades antimicrobianas. Baseado nesses trabalhos surgiu o interesse de estudar a possível ação da palmatina em cepas de *Candida* resistentes a azólicos. Foram levantadas as seguintes hipóteses neste trabalho:

3.1. Palmatina inibe o crescimento *in vitro* de cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

3.2. Palmatina causa morte celular em cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

3.3. Palmatina tem ação antifúngica contra biofilmes de espécies de *Candida* spp. resistentes a azólicos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Determinar o potencial antifúngico, *in vitro*, da palmatina frente cepas de *Candida* spp. resistentes à azólicos pertencentes a micoteca do LABEL (Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras) da Universidade Federal do Ceará.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a sensibilidade de cepas de *Candida* spp. resistentes à azólicos frente a combinações do palmatina com fluconazol, itraconazol e voriconazol;
- ✓ Realizar ensaio de citotoxicidade da palmatina em células de mamífero;
- ✓ Avaliar por citometria de fluxo a viabilidade celular, produção de EROS, alterações no potencial de membrana mitocondrial e externalização da fosfatidilserina em diferentes tempos de exposição à palmatina (3, 6, 12 e 24 h) em uma cepa de *Candida albicans* resistente à azólicos;
- ✓ Avaliar os danos ao DNA através do ensaio do cometa, na presença e ausência da enzima formamido pirimidina glicosilase (FPG);
- ✓ Identificar e quantificar, por meio de espectrometria de massas, as proteínas expressas quando *Candida albicans* é exposta a palmatina;
- ✓ Avaliar a ação da palmatina em cepas de *Candida* spp. sobre o biofilme formado e sobre seu processo de formação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Recuperação das cepas

Neste estudo foram utilizadas 20 cepas clínicas de *Candida* spp. identificadas molecularmente (6 *C. albicans*, 7 *C. tropicalis*, 6 *C. parapsilosis*, 1 *C. glabrata*) e 2 cepas padrão ATCC (*C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL).

As cepas estavam estocadas em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As leveduras foram descongeladas e ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35°C . Em seguida, foram repicadas em ágar Sabouraud e incubadas por até 48 horas a 35°C . A fim de verificar a pureza, cada amostra foi semeada em meio cromogênico HiCrome *Candida* differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 48 horas a 35°C . Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2 (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.2. Antifúngicos

Os fármacos utilizadas neste estudo foram: fluconazol (FLC), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), anfotericina B (ANFO B), palmatina (PALM) obtidos da Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA). As soluções de ITC, VRZ, ANFO B e PALM foram diluídas em DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e o FLC foi diluído em água destilada estéril. Os antifúngicos foram utilizados nas faixas 64 a $0,125\text{ }\mu\text{g/mL}$ (FLC); 256 a $0,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ (PALM); 16 a $0,0313\text{ }\mu\text{g/mL}$ (ITRA); 16 a $0,0313\text{ }\mu\text{g/mL}$ (VRZ) e 16 a $0,0313\text{ }\mu\text{g/mL}$ (ANFO B) (CLSI, 2008).

5.3. Teste de Sensibilidade aos antifúngicos

5.3.1. CLSI

O instituto de padronização em laboratórios clínicos (CLSI, do inglês, *Clinical Laboratory Standards Institute*) é um órgão que atua na padronização de testes de

sensibilidade. A metodologia empregada nesse trabalho segue as normais do protocolo M27-S4, publicado em dezembro 2012, que traz o método de referência para o teste de microdiluição em caldo para verificação da sensibilidade em leveduras. Neste documento, todos os passos do teste são descritos: qual meio deve ser utilizado; como realizar a diluição da substância a ser testada; quantidade do inóculo fúngico; modo de leitura; tempo de leitura; quais cepas controles (ATCC, *American Type Culture Collection*) devem ser utilizadas para validar o teste de sensibilidade. Os documentos publicados pelo CLSI são constantemente revisados para garantir que os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de cada substância esteja de acordo com os valores encontrados na clínica. Os documentos trazem também os pontos de corte (*breakpoints*) que determinam se o microrganismos é resistente ou sensível a determinada substância, possibilitando prever possíveis falhas terapêuticas. O uso dos protocolos do CLSI são internacionalmente aceitos e garantem que os dados obtidos sejam confiáveis e reprodutíveis (CLSI, 2012).

5.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos

O teste de sensibilidade foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH $7,0 \pm 0,1$) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Para a realização dos testes foram utilizadas placas de 96 poços fundo U. Na coluna dois foram adicionados 200 μ L das drogas e em seguida realizou-se a diluição seriada para obter o intervalo desejado. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e a coluna 12 como controle positivo do teste (inóculo + meio). A partir de um cultivo de 24 horas dos isolados a serem testados, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Um volume de 100 μ L desta suspensão padronizada foi adicionado em cada poço contendo a fármaco antifúngico. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35 °C (± 2 °C) e após esse período a leitura visual foi realizada.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da fármaco capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em

comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (coluna 12) para os derivados azólicos e palmatina (CLSI, 2008).

Para avaliar a ocorrência de resistência aos azólicos foram levados em consideração os seguintes pontos de corte: CIM $\geq 1 \mu\text{g/ mL}$ para itraconazol e voriconazol e CIM $\geq 8 \mu\text{g/ mL}$ para fluconazol (CLSI, 2012). Todo o experimento foi realizado em triplicata e foram utilizadas as cepas controle: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

5.3.3 Teste do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: *checkerboard*

Após a determinação do CIM de cada fármaco isolado, foi realizada a técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). Nesta técnica, cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações dos fármacos testadas, no qual se determina o percentual de inibição do crescimento das células na presença de diferentes combinações dos fármacos em relação ao poço controle. Assim as cepas foram expostas a concentrações de PALM (256 a 0,5 $\mu\text{g/ mL}$); FLC (64 a 0,125 $\mu\text{g/ mL}$); ITRA (16 a 0,0313 $\mu\text{g/ mL}$); VRZ (16 a 0,0313 $\mu\text{g/ mL}$) quando testadas isoladamente e ITC (0, 125 $\mu\text{g/ mL}$), FLC (4,0 $\mu\text{g/ mL}$) e VRZ (0,125 $\mu\text{g/ mL}$) quando testadas em associação com a PALM (256 a 0,5 $\mu\text{g/ mL}$). A interação entre os fármacos foi realizada a partir da determinação do FICI (*fractionary inhibitory concentration*) o qual é obtido pela soma do FIC de cada fármaco, que se trata da relação entre o CIM de cada fármaco utilizada em combinação e o CIM da mesma fármaco utilizada sozinha (Quadro 1). Desta forma, foram considerados os seguintes parâmetros: FICI $\leq 0,5$: sinergismo, FICI $> 4,0$: antagonismo e $0,5 < \text{FICI} < 4,0$: indiferente (ODDS, 2003).

$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$ <p>Onde: $\text{FIC}_A = \text{CIM}_{\text{fármaco A em combinação}} / \text{CIM}_{\text{fármaco A isoladamente}}$ $\text{FIC}_B = \text{CIM}_{\text{fármaco B combinação}} / \text{CIM}_{\text{fármaco B isoladamente}}$</p>

Quadro 1- Determinação do Índice de Combinação Inibitória Fracionária

5.3.4. Análise dos dados

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM.

5.4. Cultivo de células L929

Foram cultivadas células L929 de fibroblasto murino adquiridas de um banco de células do Rio de Janeiro sob condições padrões (a 37 °C com 5% de CO₂) em MEM (meio essencial mínimo) contendo sais de Earle. Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 ug/ mL de penicilina e 100 ug/ mL de estreptomicina. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, as células foram cultivadas durante 2 dias sob condições padrão e depois o meio foi substituído com meio fresco contendo palmatina ou DMSO (controle). A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida constante, isto é, menos do que 0,1 % (v/ v) (CAVALCANTI *et al.*, 2009, NETO *et al.*, 2014).

5.4.1. A inibição da viabilidade de células L929 utilizando o teste MTT

A viabilidade celular foi quantificado pela capacidade das células vivas de reduzir o sal de tetrazólio para o produto de formazan púrpura. As células L929 foram semeadas em placas de 96 poços (0,3 x 10⁶ células/ poço) e a PALM (0,25 a 100 µg/ ml) dissolvida em DMSO a 0,1% foram então adicionadas a cada poço, seguido de incubação durante 24 h, sob cultivo em condições padrões. Em seguida, as placas foram centrifugadas e o meio foi substituído com meio fresco (150 µL) contendo 0,5 mg/ ml de MTT. Após 3 h, foi adicionado em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida utilizando um leitor multiplacas (contagem Packard Spectra, Canadá). O efeito na viabilidade celular da palmatina foi quantificado como a percentagem de controle de absorbância do corante reduzido a 595 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos três vezes (CAVALCANTI *et al.*, 2009, NETO *et al.*, 2014).

5.5. Testes utilizando citometria de fluxo

5.5.1. Preparo das suspensões de células de *Candida* spp.

Para os ensaios de citometria de fluxo foi utilizado um isolado de *C. albicans* (Tabela 2). A cepa de *Candida* spp. foi semeada em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, a levedura foi suspensa em 5 mL de meio YPD e reincubada sob as mesmas

condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Por fim, as células ($\sim 10^6$ células/ mL) foram ressuspensas em meio RPMI (Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.5.2 Tratamento das células de *Candida albicans*

Para a determinação da viabilidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e marcação por anexina V, a cepa de *Candida albicans* resistente a azólicos foi exposta ao FLC (64 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ANFO B (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PALM (CIM, 2x CIM e 4x CIM) e em meio RPMI que foi utilizado como controle negativo. As células tratadas foram incubadas a 37 °C durante os períodos de 3, 6, 12 e 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (DA SILVA *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2014).

5.5.3 Determinação da viabilidade celular

As células de *C. albicans* após exposição à PALM durante os intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 h foram marcadas com o marcador PI (iodeto de propídeo) e sem seguida, foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.5.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) em células de *Candida albicans*

As células de *C. albicans* após exposição à PALM durante os intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 h foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro. Posteriormente, foram lavadas duas vezes com PBS e reincubadas a 37 °C por 30 min. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2014).

5.5.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio em células de *Candida albicans*

Para a detecção de EROs produzidas durante um período de cultura de 24 h, as células foram incubadas com H₂DCFDA (20 µM) (Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína) (Sigma, USA), durante 30 min, no escuro, a 35 °C. Subsequentemente, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas imediatamente por citometria de fluxo (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.5.6. Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de *Candida albicans*

As células de *C. albicans*, após exposição à PALM durante os intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 h, foram coletadas por centrifugação e digeridas com Zymolyase 20T (2 mg/mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de potássio (PPB, 1 M pH 6,0) durante 2 h a 30 °C. Os esferoplastos de *C. albicans* foram ressuspensos em uma solução contendo anexina V- FITC (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA) e PI (Sigma, USA) ausência de luz e a 37 °C. Após 20 min a suspensão foi analisada por citometria de fluxo. Para cada experimento 10000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.5.7. Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo

Os dados obtidos foram analisados a partir da média ± erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls (p <0,05), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.6. Ensaio do Cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por MILOSHEV; MIHAYLOY; ANACHKOVA (2002). Até 200 µL de agarose 0,5% (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) foi espalhada em cada lâmina e seca a temperatura ambiente antes da aplicação da suspensão de células sobre as lâminas. As células de *Candida*

spp. foram centrifugadas em microcentrífuga de eppendorf durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH_2PO_4 , pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10^4 células foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (37 °C) contendo de Zymolyase 20T (2 mg/ mL) e espalhado sobre as lâminas, coberto com lamínulas e incubadas durante 20 min a 30 °C para desintegrar a parede da célula de levedura e obter os esferoplastos. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos que se seguem foram realizados numa sala fria a 8 a 10 °C. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução (30 mM de NaOH, 1M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min cada em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetido a eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada por 20 min a 0,5 V/cm e amperagem ajustada para 24 mA. Após eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas por 10 min em etanol 76% e 96%. Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com brometo de etídio (1 mg/ mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência. Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas para cada grupo experimental. A leitura é feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado - 0 a dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS, 2004).

5.6.1. Análise da oxidação de bases purinas do DNA

Esse teste é outra versão do ensaio do cometa. Ele utiliza a enzima formamido-pirimidina- DNA glicosilase (FPG) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que detecta a oxidação de bases purinas. O método é semelhante ao do cometa alcalino, mas com pequenas modificações. Resumidamente, as lâminas foram removidas da solução de lise, e lavadas três vezes em tampão enzima (40 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 0,5 mM de Na_2EDTA , 0,2 mg/mL de BSA, pH 8.0), secas, e incubadas com 70 μL de FPG por 30 min a 37 °C. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas visualmente por grupo. A quantidade de purinas oxidadas (FPG-

sensíveis) foi então determinada pela subtração da quantidade de quebras de fita (amostras incubadas somente com tampão) com a quantidade de quebras totais obtidas após incubação com FPG de acordo com da Da Silva *et al.* (2011).

5.6.2. Análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.7. Análise Proteômica em células de *Candida albicans* expostas a PALM

5.7.1. Preparo e tratamento das células de *Candida albicans*

Para este teste foi escolhida uma cepa representativa de *C. albicans* (ver Tabela 2). A cepa em estoque foi semeada em meio ágar Sabouraud dextrose e incubada a 35 °C por 24 h. Em seguida, a levedura foi ressuspensa em 5 mL de meio YPD e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 5 min. e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Posteriormente, as células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Por fim, foi adicionada a PALM (CIM = 64 μ g/ mL) e incubadas a 35 °C por 24 horas. O meio RPMI + suspensão foi utilizado com controle negativo (YOO *et al.*, 2013).

5.7.2. Lise celular e solubilização de células de *C. albicans*

Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (3000 g por 5 min) e o *pellet* foi ressuspensa em tampão de amostra (100 mM Tris-HCL, pH 7). As suspensões celulares foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento para romper as membranas celulares e extrair proteínas presentes na amostra. Em seguida, as amostras foram sonicadas (três pulsos, 1 min) e centrifugadas a (12000 g por 20 min). O sobrenadante foi removido e estocado a -80°C até o momento da análise (YOO *et al.*, 2013).

5.7.3. Identificação e quantificação de proteínas por espectrometria de massa

De modo a preparar as amostras para a análise por espectrometria de massa, o extrato protéico obtido após a lise celular foi desnaturado na presença de 0,2% da solução do surfactante *RapiGest SF* (Waters, Milford, USA), em uma solução de NH_4CO_3 adicionados a fração protéica e incubadas a 80 °C durante 15 min. Em seguida, foram adicionadas as amostras 5 μL de ditionotereitol (DTT) (100 mM) a 60 °C durante 30 min, para a abertura das proteínas, facilitando o acesso para alquilação e digestão. Após um *vortex*, a amostra foi colocada em chapa aquecedora a 60 °C por 30 min e em seguida, foram adicionados 5 μL de iodoacetamida (IAA) (300 mM) para alquilação das cisteínas por 30 min à temperatura ambiente, no escuro. Após este período, 1 μg da enzima tripsina (Promega, Madison, WI, USA) foi adicionada às amostras a 37 °C durante 20 h. A digestão foi parada pela adição de 10 μL de ácido trifluoroacético 5% (TFA) à mesma temperatura durante 90 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 30 min, 6 °C) e o sobrenadante foi transferido para frascos *vials*.

Finalmente, após a digestão os peptídeos trípticos da proteína rábica fosforilase B (PhospB; UniProt: P00489) foram adicionados a uma concentração final de 50 fmol/ μL como padrão interno (CURTY *et al.*, 2014). A aquisição de dados de espectrometria de massas foi realizada através de um espectrômetro de massas NanoESI-Q-TOF (Waters corporation, Manchester, UK) acoplado a um sistema de cromatografia nanoUPLC (Waters, UK). Dessa forma, inicialmente, os peptídeos trípticos foram submetidos a um processo cromatográfico utilizando o sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, UK) equipado com uma coluna de fase reversa C18 HSS T3 (1,8 μm , 75 μm x 20 mm). Então a cromatografia foi realizada com um gradiente de acetonitrila 0 a 40% (v/ v) contendo 0,1% de ácido fórmico a um fluxo de 500 nL/ min.

Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo 'V', em uma resolução de, pelo menos, 12000 m/ z. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte *NanoLockSpray*. O canal de coleta da amostra analisada foi fechado a cada 30 segundos para passagem do íon de referência.

O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de Glu- *fibrinogen peptide* (GFP) (500 fmol/ mL) injetado através do spray de referência da fonte *NanoLockSpray*. O íon duplamente carregado ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$) foi usado para a calibração de um ponto inicial (L_{teff}), e a fragmentação de íons MS/ MS do GFP foi usada para obter a calibração final do instrumento.

O espectrômetro foi programado para alternar automaticamente entre MS padrão (3 eV) e energias elevadas de colisão em rampa MSE (12 a 40 eV) na célula de colisão com gás argônio. A aquisição de dados após colisão foi realizada em faixa de 50 a 3000 m/z. A RF_{offset} (perfil MS) foi ajustada de forma que os dados de LC/MS foram efetivamente adquiridos de 300 a 3000 m/z, o que garante que qualquer massa observada nos dados de LC/MSE com menos 300 m/z surgiram de dissociações na célula de colisão.

5.7.4. Processamento de dados e análise de expressão diferencial

Para a coleta, processamento e análise dos dados foram utilizados os programas *MassLynx* v.4.1 e *ProteinLynx* v.2.4. Para a busca na base de dados apropriado foi usado *ProteinLynxGlobalServer* (PLGs) v.2.4. contendo o programa *Expression^E* v.2.4. Os Bancos de Dados UniProtKB / Swiss-Prot 57.1 e UniProtKB / TrEMBL 40.1 foram utilizados e as condições de pesquisa foram baseados em taxonomia (*Candida albicans*) (LI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006).

A quantificação absoluta para cada corrida foi calculada de acordo com a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos para cada proteína (*label-free* HI3) (SILVA *et al.*, 2006). Após a identificação e quantificação absoluta das proteínas de cada fração, algumas proteínas foram selecionadas como proteínas internas (*housekeeping*) para normalizar os níveis de expressão entre os grupos em estudo e realizar a quantificação relativa, *label-free*, de proteínas (LI *et al.*, 2009).

Dentre as proteínas identificadas, aquelas que apresentaram razão (PALM: Controle) igual ou superior a 1,5 foram consideradas superexpressas ou *up-regulated* e aquelas que apresentaram razão igual ou inferior 0,66 foram consideradas subexpressas ou *down-regulated*. Proteínas com razões de expressão entre os valores acima estabelecidos foram consideradas sem expressão diferencial ou *unchanged*.

5.8. Ensaios de Biofilme

Existem duas metodologias para se estudar a eficácia de fármacos contra microrganismos na forma de biofilme. Uma das metodologias é a inibição da formação do biofilme, ou seja, o fármaco age impedindo que o biofilme seja formado. Já a outra metodologia é aquela em que o fármaco é aplicada em um biofilme já formado, nesse caso, é

observada a capacidade da fármaco de erradicar um biofilme já existente. A estratégia terapêutica ideal é a prevenção da formação do biofilme, já que erradicar um biofilme já estabelecido é muito mais difícil (PIERCE *et al.*, 2015).

5.8.1. Crescimento dos isolados de *Candida* spp. no modo biofilme

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação de acordo com a metodologia de Pierce *et al.* (2008), com pequenas modificações. Para esses testes foram utilizados uma cepa boa formadora de biofilme de cada espécie de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Tabela 2). As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YPD e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Seguidamente, foram dispensados 200 µL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes. Por fim, pode-se visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço, estando estes apropriados para a etapa seguinte.

5.8.2. Determinação da atividade de PALM sobre biofilmes formados de *Candida* spp.

Após formação do biofilme, o fármaco (200 µL) nas diversas concentrações testadas (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM, 20x CIM) foi colocada na placa. Foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI) e um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI sem fármaco) e incubada a 35 °C por 24 h. Após este período, o fármaco foi aspirada e a placa lavada com PBS por três vezes. Em seguida, adicionou-se o corante de viabilidade celular brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/ mL) (Sigma, USA). Para cada cepa, foi utilizada uma solução na proporção (75:6); 75 mL de solução de sal de MTT (1 mg/ mL em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e incubadas por 35 °C por 18 h, no escuro. Após incubação de 18 a 20 h no escuro, o corante foi removido, os

poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 10 a 15 min, retirou-se 100 µL de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIERCE *et al.*, 2008). A concentração de PALM variou de 8 a 1280 µg/ mL e a anfotericina B de 16 a 0,03 mg/ L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.8.3. Ação da PALM na inibição da formação de biofilme em *Candida* spp.

As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h. Em seguida, as células foram transferidas para YPD caldo e reincubadas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com tampão PBS. Os pellets foram ressuspensos e a densidade celular ajustada para 1×10^6 células/ mL em RPMI. Cerca de 100 µL do inóculo foram adicionados a placa juntamente com 100 µL da solução da PALM em concentrações inibitórias e subinibitórias (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM, 20x CIM) nos poços teste. Em cada placa foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI) e um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI sem fármaco). A placa foi incubada a 35 °C por 24 h. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e os poços lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderentes. Em seguida, adicionou-se MTT (1 mg/ mL) (Sigma, USA) e após incubação de 18 a 20 h no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 5 a 15 min, retirou-se 100 µL de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço 12, que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIRES, 2010). A concentração de PALM variou de 8 a 1280 µg/ mL e a ANFO de 16 a 0,03 mg/ L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.8.4. Análise dos dados dos resultados do biofilme

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância

(ANOVA) seguidos pelos testes de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa *GraphPad prism* versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

6.1. Ensaio de citotoxicidade da palmatina em células L929

A ação da palmatina na viabilidade de fibroblastos murino (L929) foi avaliada pelo método do MTT. Após 24 h de exposição à palmatina na concentração de 0,25 a 100 µg/ ml não demonstrou interferir na capacidade proliferativa das células estudadas.

6.2. Atividade antifúngica da palmatina frente às cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

A concentração inibitória mínima das cepas em estudo foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. De acordo com a Tabela 2, podemos observar o fenótipo de resistência das cepas em estudo. Todas as cepas eram resistentes ao fluconazol, mas nem todas eram resistentes a itraconazol e voriconazol. Os valores de todas as concentrações inibitórias mínimas dos fármacos (FLU, ITRA e VRZ) podem ser vistas na Tabela em anexo. A Tabela 2 mostra que a palmatina teve atividade antifúngica nas cepas testadas com o CIM variando de 32 a 128 µg/ mL.

6.3. Avaliação da interação entre palmatina e azólicos

A fim de avaliarmos o possível efeito sinérgico entre a palmatina e os azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol) foi utilizada a técnica do *checkboard*. Inicialmente, foram selecionadas apenas 8 cepas para verificação da interação entre os fármacos. De acordo com a Tabela 3 e Tabela 4, podemos observar que os valores de FICI variaram entre 1,03 a 4,06 caracterizando efeitos indiferentes ou antagônicos: $CIM \leq 0,5$ (Sinergismo-S); $0,5 < CIM < 4,0$ (Indiferente-ID) e $CIM > 4,0$ (Antagonismo-A).

Tabela 2- Efeito antifúngico da palmatina contra cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Cepa ^a	Origem	Nº Genbank	CIM	
			Valores de CIM ^b (µg/mL)	
			Fenótipo resistência	Palmatina
<i>C. albicans</i> 71***	Sangue	KJ740179	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C. albicans</i> 105	Sangue	KJ740175	FLC, VRZ	64
<i>C. albicans</i> */** 278	Sangue	AB861478	FLC, ITRA	64
<i>C. albicans</i> 289	Sangue	KJ740176	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C. albicans</i> 442	Sangue	KJ740174	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C. albicans</i> 938	Sangue	AB861479	FLC, VRZ	128
<i>C.parapsilosis</i> 43	Sangue	KJ740188	FLC, ITRA	32
<i>C. parapsilosis</i> 158	Sangue	AB861485	FLC, ITRA	64
<i>C.parapsilosis</i> 271	Sangue	KJ740191	FLC, ITRA	32
<i>C. parapsilosis</i> ** 356	Sangue	KJ740186	FLC, ITRA	32
<i>C. parapsilosis</i> 1154	Sangue	AB861488	FLC, ITRA	128
<i>C. parapsilosis</i> N5	Sangue	AB861486	FLC, ITRA, VRZ	80,6
<i>C. parapsilosis</i> 1980	Sangue	AB861487	FLC, VRZ	101,6
<i>C.tropicalis</i> ** 23	Sangue	AB861490	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C.tropicalis</i> 72	Sangue	KJ740181	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C.tropicalis</i> 180	Urina	AB861491	FLC	64
<i>C.tropicalis</i> 574	Sangue	KJ740185	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C.tropicalis</i> 716	Sangue	AB861493	FLC, VRZ	50,8
<i>C.tropicalis</i> T4	Sangue	KF616840	FLC, ITRA	64
<i>C. glabrata</i> 312	Sangue	AB861484	FLC, ITRA, VRZ	64
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-	-	32
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	-	-	-	64

^a Cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

^b O CIM foi definido como a menor concentração da fármaco que produziu 50 % de redução de crescimento fúngico após 24 h de incubação em *Candida* spp. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-S4 do CLSI. Os valores do CIM são expressos em µg /mL. O CIM representa a média geométrica de pelo menos 3 CIM determinados em diferentes dias.

* Cepa representativa utilizada para investigar o mecanismo de ação da palmatina.

** Cepas utilizadas para o teste do biofilme.

Tabela 3- Efeito da Associação da palmatina (PALM) com itraconazol (ITC), fluconazol (FLC) e voriconazol (VRZ) contra cepas de *Candida* spp. à azólicos

Cepas ^a	CIM isolado ^b (µg/mL)			CIM associado ^c (µg/mL)		FICI ^d		Análise ^e
	ITC	FLC	PALM	ITC/ PALM	FLC/ PALM	ITC + PALM	FLC + PALM	
<i>C.albicans</i> 278	4,0	32	64	0,125/64	4,0/64	1,03	1,12	I/I
<i>C.albicans</i> 71	4,0	16	64	0,125/256	4,0/256	4,03	4,25	I/A
<i>C.albicans</i> 289	4,0	32	64	0,125/128	4,0/256	2,03	4,12	I/A
<i>C.tropicalis</i> 574	2,0	16	64	0,125/256	4,0/256	4,06	4,25	I/A
<i>C.tropicalis</i> T4	1,0	16	64	0,125/128	4,0/128	2,12	2,25	I/I
<i>C.parapsilosis</i> 271	2,0	16	32	0,125/64	4,0/128	2,06	4,25	I/A
<i>C.parapsilosis</i> 356	4,0	16	32	0,125/128	4,0/128	4,03	4,25	I/A
<i>C.parapsilosis</i> 158	1,0	16	64	0,125/64	4,0/64	1,12	1,25	I/I

^a Cepas isoladas de amostras biológicas. ^b Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração que produziu redução de 50% do crescimento de células fúngicas após 24 h de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- S4 do CLSI 2012. ^c Foram utilizadas as faixas de concentrações de FLC (64 a 0,125 µg/ mL); PALM (256 a 0,5 µg/ mL); ITC (16 a 0,03 µg/ mL), quando testadas isoladamente e ^dITC (0,125 µg/ mL), FLC (4 µg/ mL), VRZ (0,125 µg/ mL) associadas a PALM (256 a 0,5 µg/ mL) . ^d O Efeito sinérgico de ITC, FLC, VRZ associado com a PALM foi calculado baseado no índice de concentração inibitória fracionária (FICI). ^e A análise/ interpretação foi de acordo com os valores de CIM: CIM ≤ 0,5 – Sinergismo (S), 0,5 < CIM<4,0 – Indiferente (I) and CIM> 4,0 - Antagonismo (A).

Tabela 4- Efeito da associação da palmatina (PALM) com voriconazol (VRZ) em cepas de *Candida* spp. resistentes à azólicos

Cepas ^a	CIM isolado ^b (µg/mL)		CIM associado ^c (µg/mL)		FICI ^d
	VRZ	PALM	VRZ/ PALM	VRZ + PALM	Análise ^e
<i>C. albicans</i> 71	2	64	0,125/ 16	0,31	S
<i>C. albicans</i> 938	2	128	0,125/ 64	0,56	I
<i>C. albicans</i> 289	2	64	0,125/ 32	0,56	I
<i>C. albicans</i> 105	2	64	0,125/ 128	2,06	I
<i>C. tropicalis</i> 716	1	50,8	0,125/ 32	0,75	I
<i>C. tropicalis</i> 574	1	64	0,125/ 64	1,12	I
<i>C. parapsilosis</i> 1980	1	101,6	0,125/ 128	1,38	I

^a Cepas isoladas de amostras biológicas. ^b Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração que produziu redução de 50% do crescimento de células fúngicas após 24 h de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- S4 do CLSI 2012. ^c Foram utilizadas as faixas de PALM (256 a 0,5 µg/ mL) e VRZ (16 a 0,03 µg/ mL), quando testadas isoladamente e ^e VRZ (0,125 µg/ mL) associadas a PALM (256 a 0,5 µg/ mL) . ^d O Efeito sinérgico de VRZ associado com a PALM foi calculado baseado no índice de concentração inibitória fracionária (FICI). ^e A análise/ interpretação foi de acordo com os valores de CIM: CIM ≤ 0,5 – Sinergismo (S), 0,5 < CIM < 4,0 – Indiferente (I) and CIM > 4,0 - Antagonismo (A).

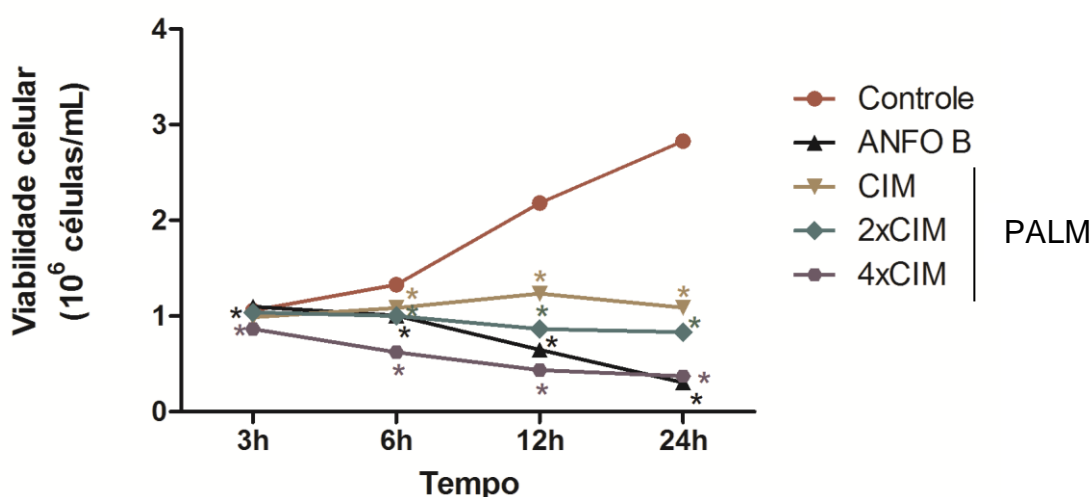
6.4. Avaliação do possível mecanismo de morte celular

Diante da ação antifúngica da palmatina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos, foi investigado o possível mecanismo de morte envolvido por meio da técnica de citometria de fluxo. Para todas as análises dos eventos celulares, foi utilizado um controle negativo contendo células de leveduras sem fármaco, anfotericina B (4 µg/ mL) como controle de morte e a palmatina foi avaliada nas concentrações do CIM (64 µg/ mL), 2x CIM (128 µg/ mL) e 4x CIM (256 µg/ mL). Para estes testes foi escolhida a cepa *Candida albicans* 278 (Tabela 2) por ser a espécie mais prevalente nos isolados clínicos. As análises foram feitas nos seguintes intervalos de tempo: 3, 6, 12 e 24 h.

6.4.1. Avaliação da viabilidade celular

De acordo com a Figura 5, palmatina quando usada nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM promoveu uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$) após 6 h de exposição em relação ao controle. Pode-se observar uma ação concentração dependente da palmatina na redução da densidade celular.

Figura 5- Avaliação da viabilidade celular em *C. albicans* resistente a azólicos exposta a palmatina em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo



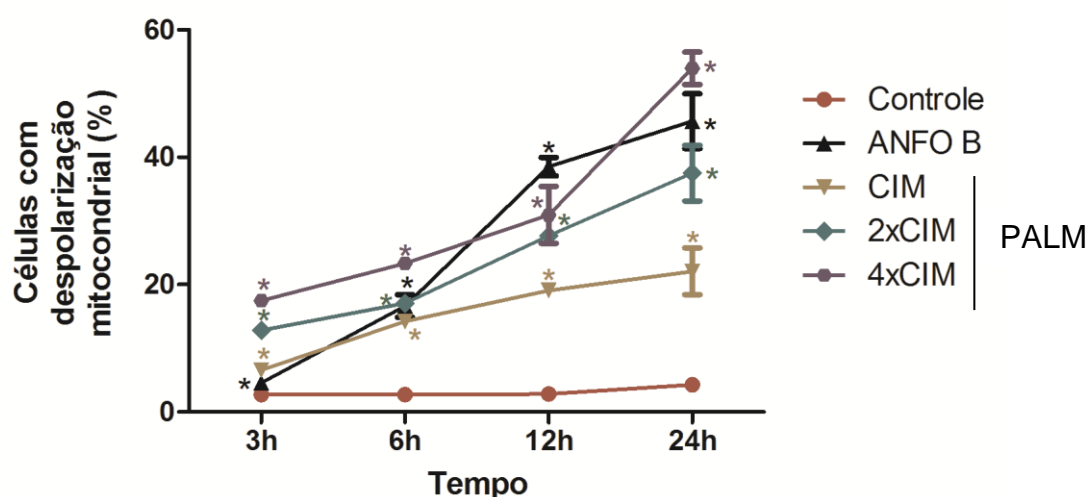
Foram utilizados controle positivo ANFO B (4 µg/mL), PALM (CIM= 64 µg/mL) nas concentrações CIM, 2X CIM e 4X CIM e avaliados após 3, 6, 12 e 24 h de tratamento em uma cepa de *Candida albicans* resistente a

azólicos. * P < 0.05 os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.4.2. Despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

De acordo com a Figura 6, as células de *Candida albicans* expostas as diferentes concentrações da palmatina (CIM, 2x CIM e 4x CIM) após diferentes intervalos de tempo, demonstraram um aumento do percentual de células com baixo potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) à medida que o CIM aumentava em relação ao grupo controle.

Figura 6- Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em *C. albicans* resistentes à azólicos expostas a palmatina em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo

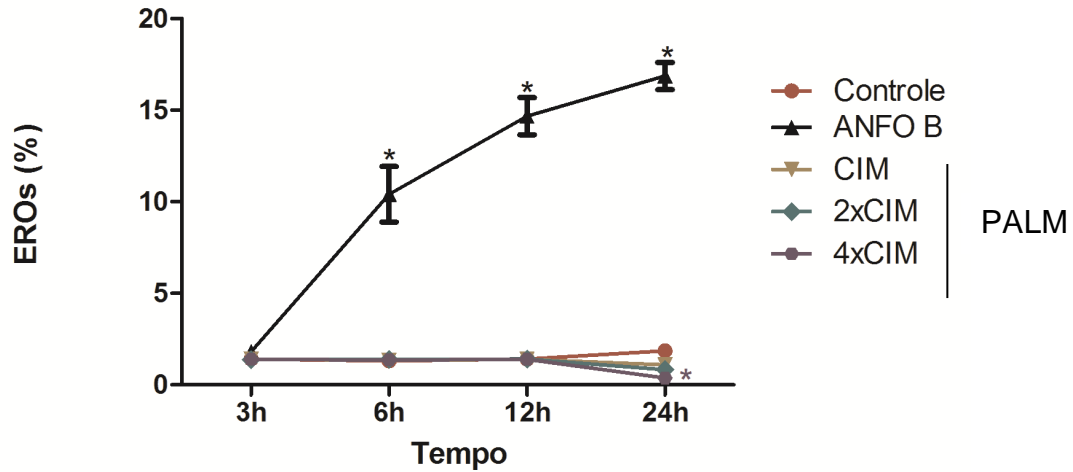


Foram utilizados controle positivo ANFO B (4 $\mu\text{g/mL}$), PALM (CIM= 64 $\mu\text{g/mL}$) nas concentrações CIM, 2X CIM e 4X CIM e avaliados após 3, 6, 12 e 24 h de tratamento em uma cepa de *Candida albicans* resistente a azólicos. * P < 0.05 os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.4.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A Figura 7 mostra que a palmatina nas diferentes concentrações usadas não provocou produção de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao controle.

Figura 7- Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em *C. albicans* resistente à azólicos expostas a palmatina em diferentes intervalos de tempo avaliada por citometria de fluxo

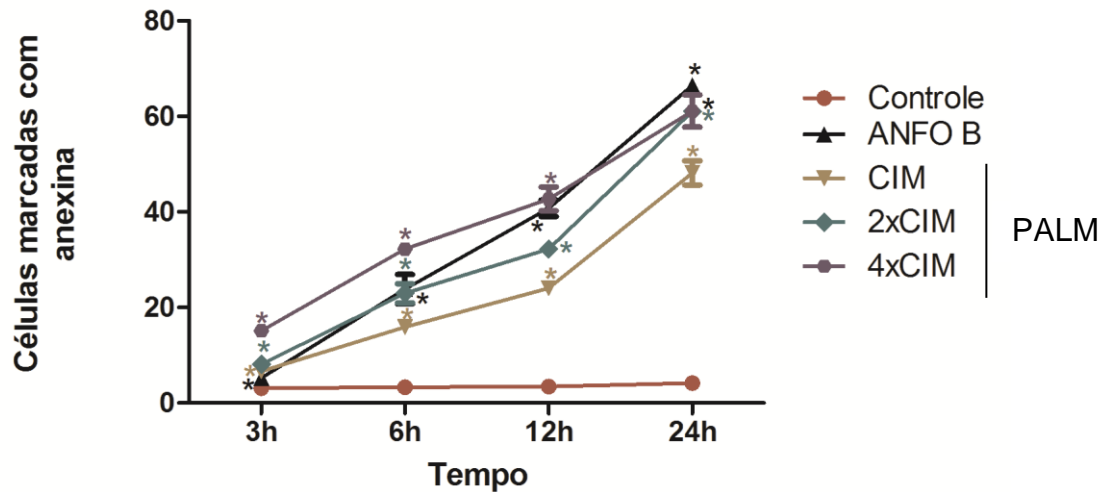


Foram utilizados controle positivo ANFO B (4 µg/mL), PALM (CIM= 64 µg/mL) nas concentrações CIM, 2X CIM e 4X CIM e avaliados após 3, 6, 12 e 24 h de tratamento em uma cepa de *Candida albicans* resistente a azólicos. * P < 0.05 os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.4.4. Externalização de fosfatidilserina

Como demonstrado pela Figura 8, *C. albicans* quando expostas às concentrações CIM, 2x CIM e 4x CIM apresentaram aumento na frequência de células com fosfatidilserina externalizadas em relação às células controle. A quantidade de anexina retida na célula é proporcional a quantidade de fosfatidilserina externalizada e indica que as células tratadas com palmatina estão em processo de apoptose inicial.

Figura 8- Externalização da fostatidilserina em *C. albicans* resistente a azólicos após 3, 6, 12 e 24 h de exposição a palmatina avaliado por citometria de fluxo

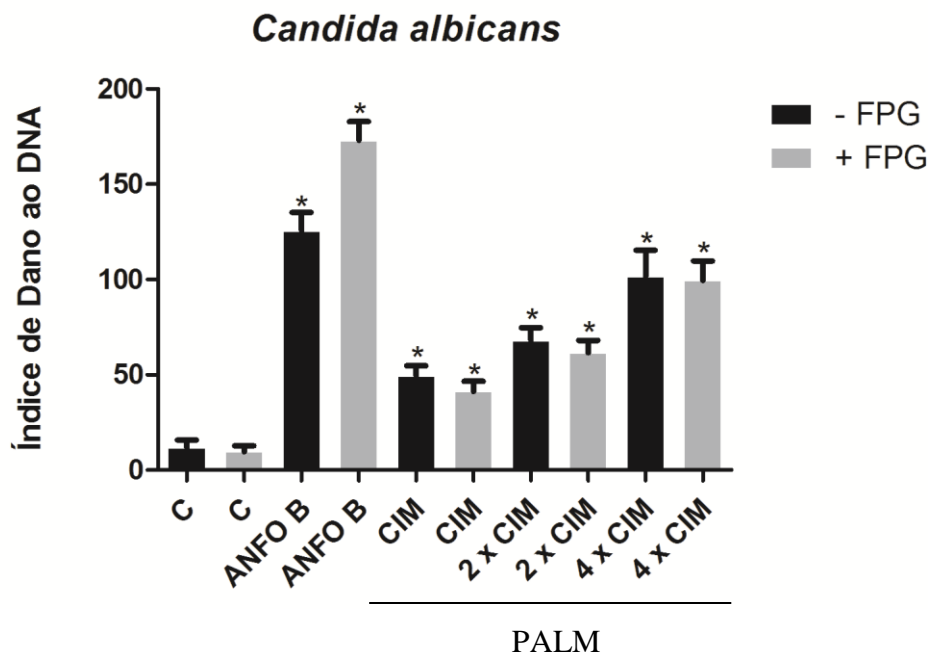


Foram utilizados controle positivo ANFO B (4 $\mu\text{g/mL}$), PALM (CIM= 64 $\mu\text{g/mL}$) nas concentrações CIM, 2X CIM e 4X CIM e avaliados após 3, 6, 12 e 24 h de tratamento em uma cepa de *Candida albicans* resistente a azólicos. * $P < 0.05$ os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.4.5. Danos ao DNA

O ensaio do cometa na versão alcalina foi utilizado para demonstrar quebras no DNA em *C. albicans*. A Figura 9, demonstra que quando as células da levedura foram expostas à palmatina nas três concentrações (CIM, 2x CIM e 4x CIM) usadas houve aumento aos danos do DNA, representando um comportamento dose dependente. Após incubar as células de *C. albicans* com a enzima FPG, não houve diferença significativa no índice de dano ao DNA na presença e ausência da enzima FPG.

Figura 9- Avaliação do índice de dano ao DNA em *C. albicans* resistente a azólicos através do ensaio do cometa versão alcalina e versão modificada (FPG) após 24 h de exposição



Foram utilizados controle positivo ANFO B (4 µg/mL), PALM (CIM= 64 µg/mL) nas concentrações CIM, 2X CIM e 4X CIM e avaliados após 24 h de tratamento em uma cepa de *Candida albicans* resistente a azólicos. * P < 0.05 os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.5. Proteínas expressas em *Candida albicans* na forma plactônica após serem expostas a palmatina

A tabela 13 demonstra todas as proteínas expressas em *C. albicans* após a levedura ser exposta a palmatina. Proteínas com razão palmatina/controle acima de 1,5 foram consideradas superexpressas (*up-regulated*) e aquelas com valores de razão abaixo de 0,66 foram consideradas subexpressas (*down-regulated*). As proteínas com valores de razão entre 0,66 e 1,5 foram consideradas sem expressão diferencial (*unchanged*).

Foram encontradas 21 proteínas *up-regulated* nas células de *C. albicans* tratadas com palmatina e seis proteínas únicas, ou seja, que só foram expressas após o tratamento com palmatina, não estando presente no controle.

Tabela 5- Identificação de proteínas expressas no extrato total nas células de *Candida albicans* por espectrometria de massa quantitativa ESI-MS/MS

Nº acesso GenBank	Descrição da proteína	Descrição funcional ¹	Categoria funcional ²	Escore	Razão ³	Nível de expressão ⁴
Q5AFP7	Alfa-1,4 glucano fosforilase	Atividade da enzima 1,4-alfa-glucano; atividade hydrolase; hidrólise de compostos O-glicosil	Produção de energia e conversão; transporte e metabolismo de carboidratos	407,35	1,30	INALTERADA
Q5AMP4	Malato desidrogenase	Atividade L-malato desidrogenase		4383,58	1,39	INALTERADA
A0A0A6MLX6	Ornitina-oxo-transaminase ácida	Ligante a piridoxal fosfato e atividade transaminase	Produção de energia e conversão	734,79	1,31	INALTERADA
Q5APD2	Malato sintase	Atividade malato sintase; ciclo do glioxilato e ciclo do ácido tricarbóxico		1283,76	2,10*	SUPEREXPRESSA
Q5A0M1	Isocitrato desidrogenase [NAD] subunidade, mitocondrial	Ligante a NAD; ligante ao íon magnésio e atividade isocitrato desidrogenase (NAD ⁺)		1257,22	1,60*	SUPEREXPRESSA
Q59RB8	Isocitrato liase	Atividade da isocitrato liase e processo metabólico do ácido carbóxico		652,57	1,63*	SUPEREXPRESSA
G6PI_CANAL	Glicose-6-fosfato isomerase	Atividade glicose-6-fosfato isomerase	Transporte e metabolismo de carboidratos	1268,30	1,32	INALTERADA
Q5AKV3	6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilase	Ligante a NADP e atividade fosfogluconato desidrogenase (descarboxilação)		808,97	1,22	INALTERADA
PGK_CANAL	Fosfoglicerato quinase	Atividade Fosfoglicerato quinase e ligante a ATP		2904,07	1,23	INALTERADA
PMGY_CANAL	Fosfoglicerato mutase	Atividade fosfoglicerato mutase		6629,62	1,57*	SUPEREXPRESSA
ADH2_CANAL	Álcool desidrogenase 2	Ligante ao íon zinco; atividade		3074,85	2,05*	SUPEREXPRESSA

		oxidoreductase				
Q5A017	Transaldolase	Sedoheptulose-7-fosfato:D-gliceraldeído-3-fosfato gliceronetransferase atividade e shunt da pentose fosfato	Transporte e metabolismo de carboidratos	238,13	1,67*	SUPEREXPRESSA
METE_CANAL	5-metiltetrahydropteriltriglutamato-homocisteina metiltransferase	Ligante ao íon zinco e atividade 5-metiltetrahydropteriltriglutamato-homocisteina S-metiltransferase	Transporte e metabolismo de aminoácidos	489,33	1,22	INALTERADA
A0A0A6MLY5	ATP sintase subunidade beta	Atividade transporte de ATP sintase; mecanismo rotacional e ligante a ATP	Transporte e metabolismo de nucleotídeo	3880,75	1,17	INALTERADA
Q5A516	Proteína carreadora de ADP e ATP	Atividade transportadora e transporte transmembrana		389,55	1,27	INALTERADA
A0A0A6MV26	ATP sintase subunidade alfa	Atividade ATPase transportadora de prótons; mecanismo de rotação; atividade ATP sintase transportadora de prótons; mecanismo de rotacional e ligante a ATP		2814,84	1,40	INALTERADA
Q5AG68	Nucleosídeo difosfato quinase	Ligante a ATP e atividade nucleosídeo difosfato quinase		993,62	1,72*	SUPEREXPRESSA
Q5ACQ1	Complexo do potencial mitocondrial I, NUAM_75kd subunidade	Atividade carreadora de elétrons; atividade NADH desidrogenase (ubiquinona)	Produção de energia e conversão; transporte e metabolismo de nucleotídeo	159,75	**	ÚNICA
Q5A4W7	Sintase do ácido graxo subunidade beta	Atividade enoil-[proteína acil carreadora] reductase (NADH)	Transporte e metabolismo de lipídeo	164,28	**	ÚNICA
HSP71_CANAL	Proteína do choque	Ligante a ATP	Transporte e catabolismo	1050,17	1,84*	SUPEREXPRESSA

	térmico SSA1					
A0A0A6M4Q7	40S proteína ribossomal S28-A	Constituinte estrutural do ribossomo	Translação, estrutura ribossomal e biogênese	1484,06	1,26	INALTERADA
Q59T44	40S proteína ribossomal S8	Constituinte estrutural do ribossomo	Translação, estrutura ribossomal e biogênese	3580,13	1,46	INALTERADA
RL13_CANAL	60S proteína ribossomal L13	Constituinte estrutural do ribossomo		2714,00	1,27	INALTERADA
Q5AFQ4	60S proteína ribossomal ácida P0	Constituinte estrutural do ribossomo		1534,90	1,27	INALTERADA
Q5AJF7	60S proteína ribossomal L12	Constituinte estrutural do ribossomo		928,28	1,30	INALTERADA
RS22_CANAL	40S proteína ribossomal S22	Constituinte estrutural do ribossomo		2728,75	1,31	INALTERADA
A0A0A6PT84	40S proteína ribossomal S14	Constituinte estrutural do ribossomo		1367,53	1,32	INALTERADA
Q5A7K0	40S proteína ribossomal S24	Constituinte estrutural do ribossomo		357,46	1,39	INALTERADA
Q59TE0	60S proteína ribossomal L17	Constituinte estrutural do ribossomo		700,10	1,42	INALTERADA
A0A0A6LBQ5	Proteína ribossomal subunidade maior L27Ae	Constituinte estrutural do ribossomo		2482,72	1,43	INALTERADA
A0A0A6MLF2	Proteína ribossomal L19	Constituinte estrutural do ribossomo		5106,19	1,51*	SUPEREXPRESSA
A0A0A6MLU3	60S proteína ribossomal L9-B	Constituinte estrutural do ribossomo; ligante a rRNA		217,94	1,51*	SUPEREXPRESSA
RL10A_CANAL	60S proteína ribossomal L10a	ligante a RNA; constituinte estrutural do ribossomo		690,78	1,52*	SUPEREXPRESSA
EF1A1_CANAL	Fator de elongação 1-alfa	Ligante a GTP; atividade GTPase	Translação, estrutura	5487,27	1,58*	SUPEREXPRESSA

	1	e ativação do fator de alongação e tradução	ribossomal e biogênese			
A0A0A6Q5W2	60S proteína ribossomal L36	Constituinte estrutural do ribossomo e tradução		2022,08	1,70*	SUPEREXPRESSA
A0A0A6LXJ2	40S proteína ribossomal S6	Constituinte estrutural do ribossomo e tradução		1451,99	1,79*	SUPEREXPRESSA
A0A0A6MLL6	40S proteína ribossomal S19-A	Constituinte estrutural do ribossomo e tradução		2091,42	2,08*	SUPEREXPRESSA
Q5ADQ6	40S proteína ribossomal S12	Constituinte estrutural do ribossomo e tradução		822,08	5,81*	SUPEREXPRESSA
HSP60_CANAL	Proteína do choque térmico 60, mitocondrial	Ligante a ATP		1455,93	1,31	INALTERADA
HSP90_CANAL	Proteína do choque térmico homóloga 90	Ligante a ATP, enovelamento de proteínas, a resposta ao estresse	Processamento de informação genética	2325,54	1,28	INALTERADA
HSP77_CANAL	Proteína do choque térmico SSC1, mitocondrial	Ligante a ATP e atividade nucleosídeo- trifosfatase		961,40	1,62*	SUPEREXPRESSA
Q59KV8	Proteína sensorial de esfingolípideos de cadeia longa	Regulação negativa da atividade da proteína quinase; resposta ao calor e endocytose	Modificação pós-translacional, turnover de proteínas, chaperona	1720,75	1,52*	SUPEREXPRESSA
Q59VF6	Proteína sensorial de esfingolípideos de cadeia longa	Regulação negativa da atividade da proteína quinase; resposta ao calor e endocitose		1221,39	1,62*	SUPEREXPRESSA
TSA1_CANAL	Peroxiirredoxina TSA1	Atividade antioxidante e peroxiredoxina	Resposta ao stress	3045,19	1,26	INALTERADA
SAHH_CANAL	Adenosil-homocisteinase	Atividade adenosil-homocisteinase	Não classificada	1794,40	1,28	INALTERADA
EF2_CANAL	Fator de alongação 2	Atividade GTPase e ligante a GTP	Não classificada	2261,99	1,31	INALTERADA

VDAC_CANAL	Porina de membrana mitocondrial externa	Atividade canal aniônico dependente de voltagem		1995,98	1,32	INALTERADA
IPYR_CANAL	Pirofosfatase inorgânica	Ligando de magnésio e atividade difosfatase inorgânica		1260,07	1,36	INALTERADA
Q59WG3	Proteína 48 de controle da divisão celular	Ligante a ATP e atividade nucleosídeo-trifosfatase		173,61	1,39	INALTERADA
Q5A397	Proteína semelhante a Hsp75	Ligante a ATP		3019,86	1,25	INALTERADA
Q5AAH6	Citocromo P450 52A2	Ligante ao íon ferro; ligante ao heme; atividade oxidoreductase; agindo sobre os doadores emparelhados, com a incorporação ou redução do oxigênio molecular, flavina reduzida ou flavoproteína como um doador, e a incorporação de um átomo de oxigênio	Não classificada	156,65	**	ÚNICA
Q59VH9	Obg semelhante a ATPase 1	Ligante a GTP; ligante a subunidade maior do ribossomo; ligante ao ribossomo; atividade ATPase e ligante a ATP	Proteína não caracterizada	264,73	1,72*	SUPEREXPRESSA
IF4A_CANAL	RNA helicase dependente de ATP eIF4A	Ligante a ATP; atividade helicase dependente de ATP; ligante a ácido nucléico	Fator de iniciação de translação eucariótica	1111,23	1,88*	SUPEREXPRESSA
A0A0A6MCI0	Aminopectidase 2	Ligante ao íon zinco e atividade metaloproteinase		264,77	**	ÚNICA
APE2_CANAL	Aminopectidase 2	Ligante ao íon zinco e atividade	Modificação pós-	266,97	**	

		metaloproteinase	translacional, turnover de proteínas, chaperona			ÚNICA
A0A0A6MV05	Aminopectidase 2	Ligante ao íon zinco e atividade metaloproteinase		264,28	**	ÚNICA

¹ Termos para função molecular e de processo biológico de cada proteína identificada são mostrados de acordo com o OrthoDBv8 (catálogo hierárquico de ortólogos de eucariotos) (acessado em 17 de dezembro de 2015)

² Catálogo de anotações KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto)

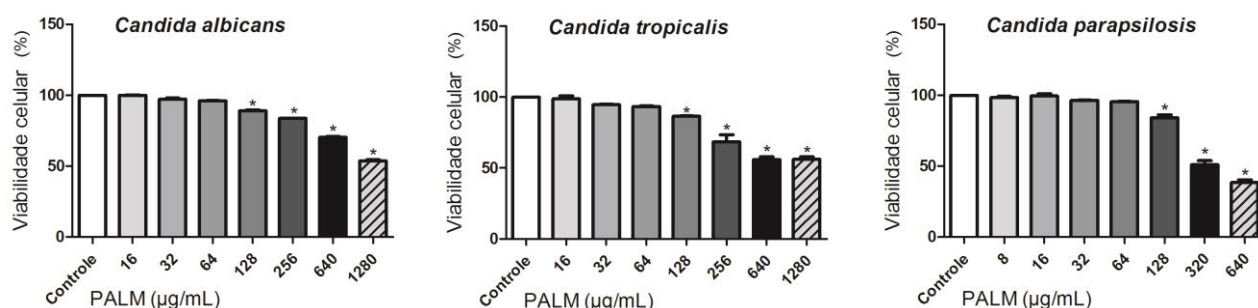
³ Valores de Fold-change marcados com um asterisco (*) são significativos (p<0.05)

⁴ Proteínas únicas em células expostas a palmatina (**)

6.6. Determinação da atividade de palmatina sobre biofilmes formados de *Candida* spp.

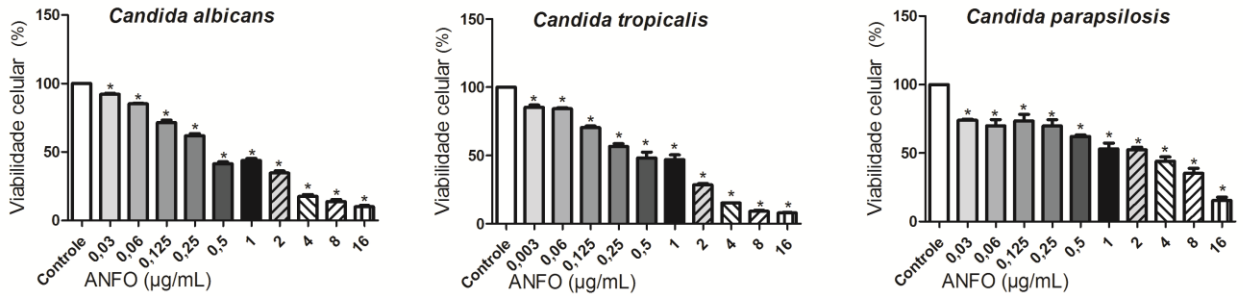
Devido à importância da organização de microrganismos em biofilmes, verificamos se a palmatina também era capaz de agir contra biofilmes formados e em formação em diferentes espécies de *Candida* spp. Conforme se pode observar na Figura 11, palmatina foi capaz de inibir biofilme formado nas principais espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Foram utilizadas concentrações inibitórias e subinibitórias (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM, 20x CIM). Em *C. albicans* uma concentração de 20x CIM provocou uma redução próxima a 50% da viabilidade celular do biofilme em relação ao controle de crescimento. Já em *C. tropicalis* a redução próxima a 50% foi observada na concentração de 10x CIM, resultado similar foi observado em *C. parapsilosis*. Os perfis de inibição do biofilme formado também foram realizados utilizando uma faixa de concentração de ANFO B (16 a 0,03 µg/ mL) conforme mostrado na Figura 12.

Figura 10- Atividade da palmatina frente ao biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliada pelo do método do MTT



PALM foi testada nas concentrações inibitórias (CIM, 2x CIM, 4x CIM) e subinibitórias (CIM/4, CIM/2). Foram utilizados uma cepa boas formadora de biofilme de cada espécie: *Candida albicans* (CIM= 64 µg/mL), *Candida tropicalis* (CIM= 64 µg/mL) e *Candida parapsilosis* (CIM= 32 µg/mL). A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de redução do MTT.

Figura 11- Perfil da anfotericina B contra biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliada pelo do método do MTT.

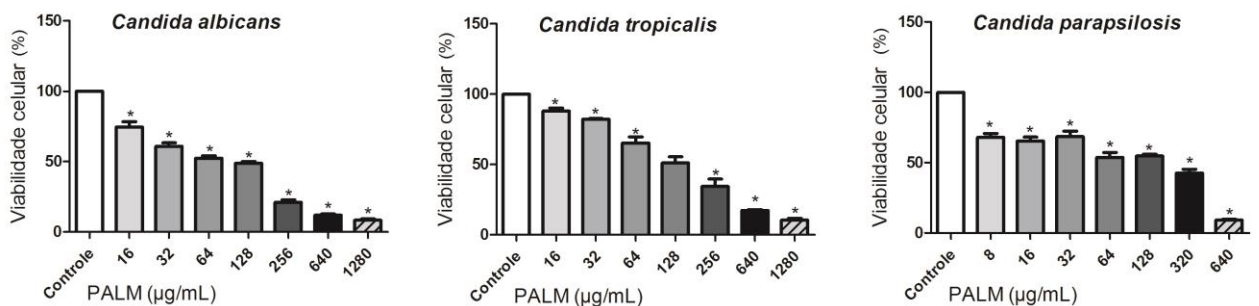


ANFO B foi testada na faixa de 16 a 0,03 µg/ mL. A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de redução do MTT.

6.7 . Ação da palmatina na inibição da formação de biofilme em *Candida* spp.

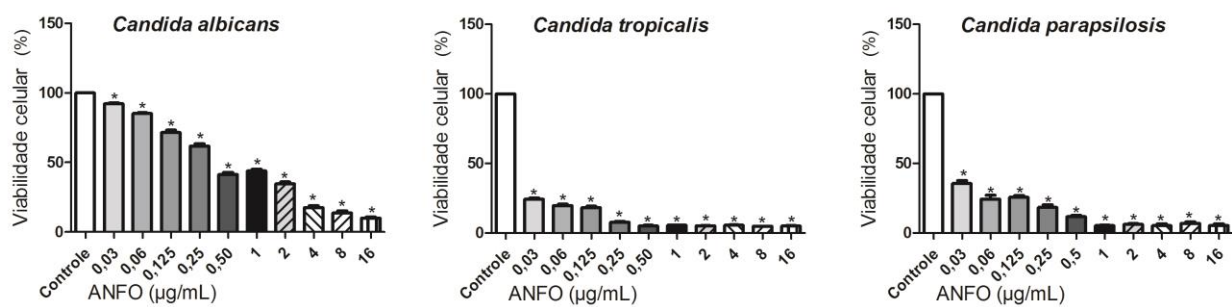
A Figura 13 mostra que a palmatina foi capaz de inibir a formação do biofilme nas principais espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Em *C. albicans* uma concentração de CIM provocou uma redução próxima a 50% da viabilidade celular do biofilme em relação ao controle de crescimento ($p < 0,05$). Já em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foi observado uma redução próxima a 50% na concentração de 2x CIM. Os perfis de inibição da formação do biofilme também foi realizado utilizando uma faixa de concentração de ANFO B (16 a 0,03 µg/ mL) conforme mostrado na Figura 14.

Figura 12- Atividade da palmatina na inibição da formação do biofilme em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliada pelo do método do MTT



PALM foi testada nas concentrações inibitórias (CIM, 2x CIM, 4x CIM) e subinibitórias (CIM/4, CIM/2). Foram utilizados uma cepa boas formadora de biofilme de cada espécie: *Candida albicans* (CIM= 64 µg/mL), *Candida tropicalis* (CIM= 64 µg/mL) e *Candida parapsilosis* (CIM= 32 µg/mL). A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de redução do MTT.

Figura 13- Perfil da anfotericina B contra biofilme em formação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliada pelo do método do MTT



ANFO B foi testada na faixa de 16 a 0,03 µg/ mL. A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de redução do MTT.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que a palmatina possui atividade em diferentes espécies de *Candida*, tais como, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Os MICs encontrados variaram de 32 a 128 µg/ mL, sendo o menor valor de MIC para as cepas de *C. parapsilosis*. Nossos resultados estão de acordo com um trabalho feito por Park *et al.* (1999) em cepas clínicas e identificaram uma maior atividade antifúngica da palmatina em cepas de *C. parapsilosis*, exibindo MIC menor que 16 µg/ mL. Já nas outras cepas testadas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*) os MICs foram maiores que 500 µg/ mL.

Outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa identificou atividade antifúngica da berberina em cepas de *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol apresentando MICs iguais a 8 µg/ mL para *Candida* spp e de 16 a 24 µg/ mL para *Cryptococcus neoformans*. Vale salientar que na literatura existe uma grande escassez de artigos que demonstrem a atividade antifúngica da palmatina em cepas de *Candida*. Por isso, os resultados apresentados nesse presente trabalho irão ser confrontados com os dados da atividade anticandida da berberina por serem ambos alcalóides protoberberinas e apresentarem estruturas muito semelhantes.

Liu *et al.* (2011) investigaram a ação antifúngica pelo método de difusão em ágar de extratos de plantas medicinais chinesas (*Rhizoma Coptidis* e *Cortex Phellodendri*) contra uma cepa de cada espécie (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*) e encontrou MICs que variaram de 50 a 100 µg/ mL para o extrato de *Rhizoma Coptidis* e 100 a 200 µg/ mL para *Cortex Phellodendri*. No presente trabalho, os MICs encontram-se de acordo com os achados de Liu *et al.* (2011), apesar de termos utilizado palmatina pura. Sabe-se que um extrato de planta apresenta muitos constituintes e muitas vezes, ocorre um efeito sinérgico entre eles. Apesar da importância de trabalhos que utilizam extratos, é necessário também que substâncias isoladas sejam testadas para que possa haver o surgimento de novos fármacos antifúngicos baseados em substâncias com estrutura conhecida.

Devido ao grande problema da resistência antifúngica, neste trabalho foram selecionadas inicialmente cepas resistentes ao fluconazol, ou seja, todas possuem MIC superior a 8 µg/ mL. Mas, com o intuito de verificarmos a presença de resistência cruzada em outros fármacos azólicos, foi decidido verificar a sensibilidade das cepas contra itraconazol e voriconazol. Apenas uma cepa de *C. tropicalis* de origem urinária foi resistente apenas ao fluconazol, todas as outras apresentaram resistência também ao itraconazol ou voriconazol.

Das 20 cepas utilizadas no estudo, 8 delas apresentaram resistência aos três azólicos testados (fluconazol, itraconazol e voriconazol). O surgimento de fármacos que possuam efeito contra cepas resistentes aos azólicos é de fundamental importância já que estes fármacos são os de escolha em hospitais públicos no Brasil (STORTI *et al.*, 2012).

Após verificar a ação da palmatina isolada, também surgiu o interesse de testar o possível sinergismo entre palmatina e azólicos. O sinergismo é um fenômeno no qual os fármacos, quando associadas, apresentam atividade maior do que quando isolados (ODDS, 2003). Ao associar fármacos, ocorre redução da quantidade do fármaco utilizado, significando redução de efeitos colaterais e economia de fármacos. Estudos demonstram que ao associar fármacos com fluconazol, mesmo em cepas resistentes, pode haver redução significativa dos MICs (DA SILVA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014). Por isso, após verificarmos a ação da palmatina contra as diferentes espécies de *Candida*, foi realizada a associação entre a palmatina e fármacos azólicos (PALM + FLC, PALM + ITRA, PALM + VRZ). Nas 8 cepas selecionadas para fazer a triagem inicial, quando expostas a PALM + FLC, o efeito foi indiferente; PALM + ITRA variou entre efeito indiferente ou antagônico. Das 7 cepas utilizadas para a avaliação, PALM + VRZ apenas uma cepa de *C. albicans* apresentou sinergismo e as demais o efeito foi indiferente. Este resultado demonstra que a palmatina não tem efeito sinérgico quando associadas aos azólicos testados.

Após comprovada a ação antifúngica da palmatina contra cepas de *Candida* spp. foi investigado a sua ação na viabilidade celular de células L929 (fibroblastos murinos). Palmatina não apresentou citotoxicidade nas células em estudo nem na mais alta concentração utilizada de 100 µg/ mL. O fato de não ser uma substância citotóxica em células de mamíferos é bastante motivador, já que esta característica é fundamental para a substância seja um promissor fármaco antifúngico.

Diante da ação antifúngica contra cepas de *Candida* spp. surgiu o interesse de estudar mais profundamente o possível mecanismo de morte celular envolvido utilizando técnicas de citometria de fluxo. As células de *Candida albicans* após serem incubadas com os fármacos em estudo, foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros: viabilidade celular, alteração do potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), danos ao DNA na presença e ausência da enzima FGP e externalização da fosfatidilserina.

Ao avaliar a densidade celular foi observado que células de *C. albicans* quando expostas a palmatina na concentração de 4x CIM houve uma redução significativa na

densidade celular. Da Silva *et al.* 2016 também verificaram uma redução no número de células viáveis quando cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* foram tratadas com berberina, na concentração de 4x CIM essa redução também foi maior que o controle de morte.

As mitocôndrias são indispensáveis para a sobrevivência de células eucarióticas, e ao mesmo tempo, essas organelas possuem os fatores celulares necessários para a morte celular, significando que elas são capazes de controlar a morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2010). Neste trabalho, a função mitocondrial em células de *Candida albicans* foi afetada após exposição a palmatina. Alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pode ser causados pela abertura de poros. Estes poros permitem a liberação de prótons e fatores pró-apoptóticos no citosol, tais como, o citocromo c (HWANG *et al.*, 2014;. HWANG *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2014). Essa permeabilidade da membrana mitocondrial é um ponto irreversível na cascata de eventos que levam a célula a morte por apoptose (GALLUZZI *et al.*, 2010). Com a finalidade de detectar a processo de despolarização mitocondrial, foi utilizado o marcador fluorescente nucleofílico rodamina 123. Este é sequestrado para dentro da mitocôndria quando o potencial de membrana está inalterado. Assim, células viáveis, apresentam maior fluorescência devido a maior quantidade de rodamina 123 ligada a suas cargas positivas internas. Já as mitocôndrias despolarizadas apresentam menor afinidade pelo corante emitindo menor fluorescência (CAVALCANTI, 2010). As células de *C. albicans* tratadas com palmatina apresentaram altas taxas de células marcadas com rodamina 123 nas três concentrações testadas (CIM, 2x CIM e 4x CIM), demonstrando que a palmatina causa danos na membrana mitocondrial.

A disfunção mitocondrial e o aumento intracelular na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel importante na indução da apoptose. EROs tais como peróxido de oxigênio, radicais superóxidos e radicais hidroxila quando se acumulam excessivamente na célula causam danos moleculares que levam a morte celular. O desequilíbrio entre excessiva taxa de EROs e baixas defesas intracelulares antioxidantes levam ao stress oxidativo, que é a maior causa da apoptose (CHO; LEE, 2011; HWANG *et al.*, 2012). Palmatina nas concentrações testadas não alterou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação ao controle. Pode-se observar também que na concentração de 4x CIM após 12 h de exposição a palmatina houve uma redução significativa de EROs em relação ao controle, provavelmente devido a ação antioxidante da palmatina.

Um estudo realizado por Pustovidko *et al.* (2013) demonstrou que palmatina e berberina podem se acumular nas mitocôndrias isoladas ou em mitocôndrias de células vivas e protegê-las de danos oxidativos de forma eficaz. Ali *et al.* (2013) realizaram um estudo no qual a palmatina foi utilizada no tratamento de câncer de pele em camundongo. Estes pesquisadores verificaram que a palmatina promoveu redução nos níveis de peroxidação lipídica, aumentando os níveis de enzimas envolvidas no processo antioxidante, tais como, catalase, glutathione e superóxido dismutase (ALI *et al.*, 2013).

No teste de produção de EROs foi utilizado o marcador H2DCFDA que se difunde através da membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares ao composto não fluorescente DCFH, este na presença de espécies reativas de oxigênio é oxidado ao composto altamente fluorescente DCF. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs formado intracelularmente (DA SILVA *et al.*, 2014).

A fim de verificar se a palmatina causa danos ao DNA de células de *C. albicans* foi realizado o teste do cometa na versão alcalina. Esta versão permite detectar quebras de fita simples e duplas no DNA induzidas por agentes químicos. Lesões de fita dupla são difíceis de reparar podendo culminar em morte celular ou mutações deletérias. Além disso, quebras simples podem ser convertidas a quebras duplas durante o processo de replicação (CAVALCANTI, 2010). Palmatina induziu intenso dano ao DNA em células de *C. albicans*. Alguns estudos demonstram que a palmatina liga-se fortemente ao DNA (BHADRA; MAITI; KUMAR, 2007; MI *et al.*, 2015). Com o intuito de verificar se a palmatina causa danos oxidativos no DNA o teste do cometa na versão alcalina foi realizado também na presença da enzima FPG. Esta enzima melhora a especificidade do teste identificando bases purinas (adenina e guanina) oxidada. Neste trabalho, não houve diferença entre o ensaio do cometa na ausência e presença da enzima FPG, demonstrando que palmatina não produz oxidação de bases purinas. Dados semelhantes foram obtidos por Da Silva *et al.* (2016) que demonstraram que a berberina induz intenso dano ao DNA, mas a presença da enzima FPG não apresenta diferença em relação ao teste na ausência da enzima.

Para verificarmos se a palmatina em células de *Candida albicans* promove morte celular por apoptose foi realizado o ensaio de externalização de fosfatidilserina. Durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo de membrana interna, é externalizado para a superfície da membrana celular, sinalizando para que a célula deva ser fagocitada por macrófagos. A anexina V é um marcador que possui alta afinidade por PS e se liga ao PS externalizado na célula em apoptose (HWANG *et al.*, 2012; CHOI; LEE, 2015). A

palmatina nas três concentrações utilizadas produziu um aumento da externalização de fosfatidilserina nas células de *C. albicans* testada, indicando que essas células estão em processo de apoptose inicial. Dados semelhantes também foram verificados por Da silva *et al.* (2016) ao realizar o mesmo teste considerando berberina em *C. albicans*.

Muitos estudos demonstram que a palmatina liga-se fortemente ao DNA e tentam elucidar como este processo ocorre (BHADRA; MAITI; KUMAR, 2007; ISLAM *et al.*, 2008; BHADRA; KUMAR, 2011; MI *et al.*, 2015; DUMONT; MONARI, 2015) de acordo com os resultados deste trabalho pode-se propor que a palmatina age a nível de DNA, causando alterações que por processos secundários causam despolarização mitocondrial levando a morte celular fúngica pelo processo de apoptose, como demonstrado pelo teste da externalização da fosfatidilserina.

Após verificarmos a ação da palmatina contra células planctônicas de *Candida* spp., surgiu o interesse de verificar a sua ação também em cepas formadoras de biofilme. Sabe-se que o biofilme é a forma prevalente dos microrganismos quando estão causando doenças, logo, é necessário que a ação das fármacos também seja estudada em biofilmes (GULATI; NOBILE, 2016). Vale salientar também que quando os microrganismos estão organizados na forma de biofilme, eles apresentam uma resistência muito maior aos antifúngicos quando comparados a sua forma planctônica (BONHOMME; D'ENFERT, 2013). Existem duas metodologias para se verificar ação antifúngica em biofilme. A primeira considera o biofilme já formado, no qual se verifica se a fármaco é capaz de erradicar um biofilme já existente. A outra metodologia é através da inibição da formação do biofilme, ou seja, a fármaco deve agir evitando que o biofilme se forme, em geral perturbando os processos de adesão celular (RANE *et al.*, 2014; SUN; LIAO; HWANG, 2015).

Para os testes do biofilme formado e em formação foram utilizados 3 cepas boas formadoras de biofilme, uma de cada espécie (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*). Foram utilizadas concentrações inibitórias e subinibitórias da palmatina (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM e 20x CIM). Quando fármacos apresentam ação em doses subinibitórias, ou seja, doses menores do que o CIM pode significar que a fármaco está agindo no sistema de comunicação celular denominado *quorum sensing*, impedindo a comunicação entre as células, evitando assim que o biofilme seja formado (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

O crescimento celular no biofilme é quantificado pela capacidade das células vivas de reduzir o corante amarelo MTT. O ensaio do MTT é baseado na capacidade da enzima

succinato desidrogenase (enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis) em converter o sal 3- (4,5- dimetil-2-tiazol) -2,5- difenil-brometo de tetrazólio (MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são de cor azul escura e insolúveis em água. Essa técnica permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula (CAVALCANTI, 2010).

Os resultados desse trabalho demonstram que a palmatina possui ação tanto em biofilmes formados quanto em biofilmes em formação nas três espécies de *Candida* testadas. Esta é uma característica fundamental para se tiver uma fármaco com boa ação antifúngica, já que uma fármaco antifúngica ideal deve possuir tanto a habilidade de matar o biofilme como de inibir a sua formação (THEBERGE *et al.* 2013). Palmatina quando testada contra biofilme formado de *C. albicans* apresentou redução aproximada de 50% do biofilme na concentração de 20x CIM, já em *C. tropicalis* essa mesma taxa de inibição foi alcançada na concentração 10x CIM, similar a *C. parapsilosis*. Da Silva *et al.* (2016) realizou o teste do biofilme formado de *C. tropicalis* frente a berberina e observou que a dose de 4x CIM apresentou uma redução da viabilidade do biofilme próxima a 50%.

Já na inibição da formação do biofilme, palmatina em *C. albicans* na concentração CIM já provocou uma redução de aproximadamente 50%, já em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* essa mesma inibição ocorreu na concentração de 2x CIM. Podemos observar que evitar a formação do biofilme é muito mais fácil do que eliminar um biofilme já estabelecido. Esses resultados são animadores já que a palmatina pode agir tanto evitando que o biofilme se forme quanto pode agir destruindo biofilmes já formados. Estudos demonstram que a dose de fármacos usadas na erradicação de biofilmes pode chegar até 2000x a dose usada em células planctônicas (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008; MARTINEZ; FRIES, 2010).

Em biofilmes, as células de *Candida* apresentam-se tanto na forma de leveduras como na forma de hifas. As hifas são necessárias para a manutenção da integridade estrutural do biofilme. A filamentação é um processo necessário na patogênese das infecções invasivas, já que permite que o fungo possa escapar das defesas imunes do hospedeiro, evitando ser fagocitado por macrófagos (SUNDARARAMAN *et al.*, 2013). Vale salientar que a mudança morfológica somente não torna o fungo invasivo, existe a necessidade de produção de proteases para que a invasão do tecido seja eficaz (MELO *et al.*, 2006).

A análise proteômica identificou 56 proteínas nas células de *C. albicans* tratadas com palmatina. Destas, 21 proteínas encontrava-se com maior expressão (up-regulated) quando

comparadas as células controle. 6 proteínas só apareceram nas células tratadas com palmatina. Dentre as proteínas únicas, ou seja, presentes apenas no grupo tratado com a palmatina destacam-se: proteína pertencente ao citocromo P450; proteína do complexo I do potencial mitocondrial; sintase do ácido graxo e três tipos de aminopeptidase.

As proteínas pertencentes ao grupo citocromo P450 são monooxigenases contendo heme que pertencem a classe das oxirredutases. Essas proteínas desempenham papel central em processos relacionados à desintoxicação de substâncias estranhas e biotransformação de fármacos. Em geral, cataliza a introdução de um átomo de oxigênio molecular em moléculas orgânicas. O gene *ALK2* codifica a enzima citocromo P450 52A2 em *Candida* que catalisa a hidroxilação de n-alcanos e ácidos graxos para a assimilação desses compostos (KOGURE; TAKAGI; OHTA, 2005; GIRHARD et al., 2013).

O complexo I do potencial mitocondrial é representado principalmente pela enzima NADH desidrogenase. Esta enzima pertence a um dos maiores complexos ligados à membrana mitocondrial conhecida por transferir elétrons do NADH para ubiquinona e na translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna (MCDONOUGH *et al.*, 2002). A mitocôndria é o principal local onde é formado ATP via cadeia transportadora de elétrons. Essa energia produzida é fundamental para o crescimento celular, síntese de macromoléculas e formação da membrana celular e parede (SHE *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2013).

A enzima sintase do ácido graxo é uma proteína que sintetiza ácidos graxos, ou seja, participa da produção de lipídeos. Os fosfolipídeos são componentes fundamentais da bicamada lipídica e membranas celulares que circundam as organelas no interior das células. A presença desta proteína unicamente em células de *Candida* tratadas com palmatina pode representar um mecanismo da levedura na tentativa de recuperar danos causados pela fármaco.

Aminopeptidases foram identificadas com maior frequência entre as proteínas únicas expressas no grupo de células de *C. albicans* tratadas com palmatina. Essas proteínas agem no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas. Em leveduras a tradução de proteínas é iniciada com metionina e a maioria das proteínas têm metionina N-terminal removida após a maturação. A remoção do iniciador metionina é importante para a atividade, estabilidade de muitas proteínas dentro das células. Palmatina causa grandes danos ao DNA de *C. albicans* devido a isso a síntese proteica encontra-se elevada. A função de metaloproteinase é essencial para a proliferação e viabilidade celular (CHIU; WONG; HOGG, 2014).

Um estudo demonstrou também a atividade da aminopeptidase na virulência em *Candida*. A virulência de leveduras está relacionada com sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas. Aminopeptidase facilita a penetração de *C. albicans* no tecido do hospedeiro, através de aminoácidos livres que serão usados para apoiar o crescimento fúngico e proliferação celular. Um estudo demonstrou a presença de aminopeptidase em 86% das amostras clínicas, demonstrando o seu papel na invasão de células epiteliais e penetração de barreiras mucosas. Estudos anteriores demonstram que a expressão de aminopeptidase foi acompanhada pela formação de hifas (STANISZEWSKA *et al.*, 2015).

A análise proteômica identificou a presença de 21 proteínas superexpressas em células de *C. albicans* em relação ao grupo controle (Tabela 13). De maneira geral essas proteínas superexpressas relacionam-se com a tentativa da célula de *C. albicans* em aumentar a produção energética já que está sofrendo danos causados pela palmatina. Esse aumento de energia é indicado pela presença de várias proteínas pertencentes a diversos ciclos biológicos (via das pentoses, glicólise, ciclo do ácido cítrico, ciclo do glioxilato), essas proteínas serão empregadas na produção de macromoléculas essenciais à manutenção da viabilidade celular. Vale salientar que existe carência de artigos na literatura que demonstrem as diversas funções que essas proteínas possuem no mecanismo celular de espécies de *Candida* quando expostas a fármacos. A seguir será discutida a função de algumas dessas proteínas superexpressas.

As proteínas do choque térmico (HSPs) são chaperonas moleculares que permitem o dobramento ótimo de proteínas recém-sintetizadas sob condições de estresse (GRUDNIAK; MARKOWSKA; WOLSKA, 2015). Na função de chaperona molecular as HSPs estão envolvidas em diversos processos celulares, podendo interagir com cadeias nascentes no processo de tradução, bem como no direcionamento de proteínas para degradação (BUSH; MEYER, 1996). Estas proteínas estão superexpressas em resposta ao stress, tais como alta temperatura, falta de nutrientes, estresse oxidativo e como resposta a ação de fármacos. A ausência de HSP leva a danos nas proteínas celulares, desdobramento e agregação. *C. albicans* possuem várias tipos de HSPs cada uma possui resposta a tensões específicas (ZAVREL; WHITE, 2015). Alguns tipos de HSPs podem regular a transição entre as formas de leveduras e hifas, sendo essencial para a virulência (KHALILI *et al.*, 2016).

Em leveduras a enzima álcool desidrogenase 2 (ADH2) possui função na fermentação. ADH2 em leveduras converte etanol em acetaldeído e somente é expressa quando os níveis de glicose são baixos. *C. albicans* pode crescer em etanol, na presença de

ADH2, porém em condições normais essa enzima não é expressa. O gene ADH2 é regulado em resposta a fase do crescimento e fonte de carbono (BERTRAM *et al.*, 1996).

A enzima nucleosídeo difosfato quinase (NDP) participa da regulação da diferenciação celular, controle do crescimento, processo de sinalização e endocitose. Também possui papel importante no desenvolvimento do dimorfismo em *Candida albicans*. A mudança levedura- hifa é de particular interesse, pois pode determinar a capacidade invasiva deste fungo. Essa transição morfológica é acompanhada de um aumento global de proteínas sintetizadas (BIONDI *et al.*, 1995).

As enzimas isocitrato liase e malato sintase são enzimas únicas pertencentes ao ciclo do glioxilato que é uma forma modificada do ciclo do ácido tricarboxílico. O ciclo do glioxilato foi inicialmente descoberto em microrganismos que precisam crescer em meio contendo acetato, etanol e ácidos graxos. Várias evidências sugerem que os microrganismos patogênicos usam principalmente ácidos graxos durante a infecção (ANSTROM; KALLIO; REMINGTON, 2003; AHN *et al.*, 2013). A inibição dessas enzimas leva a indisponibilidade de nutrientes e impede a sobrevivência dentro do macrófago. Acetil- coenzima A só pode ser assimilada através do ciclo do glioxilato, pois ignora dois passos do ciclo do ácido tricarboxílico em que dois átomos de carbonos são perdidos em CO₂. O ciclo do glioxilato desempenha um importante papel na patogenicidade permitindo a levedura sobreviver dentro de macrófagos e outras células (ANSTROM; KALLIO; REMINGTON, 2003; LATTIF *et al.*, 2006).

A enzima transaldolase é importante para o equilíbrio de metabólitos na via das pentoses fosfato, fornecendo uma ligação entre esta via e a entre a via glicolítica. Acredita-se que essa enzima encontra-se no citoplasma de *C. albicans*. A via da pentose fosfato possui a função de gerar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para a biossíntese redutora e formar ribose que é o principal componente do ATP, DNA e RNA (KELLY; KAVANAGH, 2010).

O fator de alongação 1 alfa 1 em *Candida albicans* participa na regulação da expressão gênica durante a mudança morfogênica levedura- hifa (SUNDSTROM; SMITH; SYPHERD, 1990). Além disso, participa em diversos processos necessários para o crescimento e proliferação celular, incluindo a organização do citoesqueleto, formação aparelho mitótico, e a transdução de sinal.

Fosfoglicerato mutase é uma enzima citoplasmática que catalisa glicólise e gliconeogênese. Em *C. albicans* essa enzima possui um papel chave na aderência em células

endoteliais e queratinócitos. Além dessa capacidade de adesão a *Candida* também libera proteases que ajudam na destruição tecidual da barreira endotelial. Esta proteína é expressa em *Candida* tanto na forma de levedura quanto na forma de hifa, particularmente na ponta das hifas (LOPEZ *et al.*, 2014).

É importante destacar que proteínas com razão palmatina:controle maior que 1 significa que a proteína em questão está presente em maior quantidade nas células tratadas com palmatina. Logo, todas as proteínas com razão superior a 1 tendem a estarem super expressas. Mas, dentro dos pontos de corte definidos para este estudo, somente aquelas com razão acima de 1,5 foram consideradas superexpressas. Duas proteínas que apresentaram razão maior que 1, porém menor que 1,5 merecem destaque e serão comentadas a seguir. A primeira é a peroxiredoxina e a outra é uma porina de membrana mitocondrial externa TSA1 já que estas apresentam forte correlação aos achados de citometria.

Os microrganismos aeróbios possuem sistemas antioxidantes para regular os níveis de oxidantes intracelulares. Entre estes sistemas antioxidantes destaca-se a peroxiredoxina que age na degradação enzimática de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos. Peroxirredoxinas constituem uma família de peroxidases que possuem função de proteção contra o estresse oxidativo. Dentre as peroxirredoxinas a TSA1 é a mais frequentemente encontrada em leveduras. Utilizam cisteína como principal local de oxidação durante a redução do peróxido. Um estudo revelou que levedura mutantes que não possuíam peroxiredoxina TSA1 morriam apresentando alteração na forma, progressão anormal do ciclo celular e aumento significativo de externalização de fosfatidilserina, um marcador inicial de apoptose (IRAQUI *et al.*, 2009; WEIDS; GRANT, 2014).

Uma proteína que se encontrou aumentada em células tratadas com palmatina foi a porina de membrana mitocondrial externa que é um canal aniônico dependente de voltagem. A entrada e saída de substâncias através da mitocôndria é mediada por canais presentes na membrana mitocondrial. Estes canais funcionam como condutores que permitem a passagem através da barreira hidrofóbica da membrana (ISHIKAWA *et al.*, 2004). O canal aniônico dependente de voltagem, VDAC no inglês, também tem sido demonstrado que desempenham um papel na apoptose. O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa é um evento central na morte celular por apoptose, pois permite a liberação de fatores pró-apoptóticos. Estes fatores estão localizados no espaço intermembranar mitocondrial, tais como, citocromo c que ativa as caspases que são enzimas proteolíticas que promovem a morte celular. Os canais VDAC também podem aumentar a permeabilidade da membrana

mitocondrial diretamente pela ação de proteínas da família bcl-2 (TSUJIMOTO, SHIMIZU, 2002).

8. CONCLUSÃO

Palmatina possui ação anticandida e atua ligando-se ao DNA causando danos. Também promove dano mitocondrial levando à célula a morte por apoptose, como demonstrado pela externalização de fosfatidilserina. A palmatina também possui ação tanto na erradicação de biofilmes formados como em biofilmes em formação nas três principais espécies de *Candida* testadas. Por não possuir citotoxicidade para células de mamíferos, a palmatina pode ser considerada um potencial candidato a um novo fármaco anticandida.

Perspectivas:

Os próximos passos deste trabalho será o desenvolvimento de uma formulação contendo palmatina que deverá ser testada em modelos *in vivo* de candidíase. Os dados produzidos serão protegidos através do depósitos de patentes.

REFERÊNCIAS

- AHN, C. H. *et al.* Inhibition of *Candida albicans* isocitratylase activity by cadiolides and synoilides from the ascidian *Synoicum* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 14, p. 4099-101, 2013.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.
- ALBUQUERQUE, P. *et al.* Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mbio**, v. 5, n. 1, e00986-13. doi: 10.1128/mBio.00986-13, 2013.
- ALI, H.; DIXIT, S. Extraction optimization of *Tinospora cordifolia* and assessment of the anticancer activity of its alkaloid palmatine. **Scientific World Journal**, doi: 10.1155/2013/376216, 2013.
- AL-RAWAHI, G. N.; ROSCOE, D. L. Ten-year review of candidemia in a Canadian tertiary care centre: Predominance of non-*albicans* *Candida* species. **Canadian Journal Infectious Diseases Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, e65- 8, 2013.
- ANSTROM, D. M.; KALLIO, K.; REMINGTON, S. J. Structure of the *Escherichia coli* malate synthase G: pyruvate:acetyl-coenzyme A abortive ternary complex at 1.95 Å resolution. **Protein Science**, v. 12, n. 9, p. 1822-32, 2003.
- BARROS, P. P. *et al.* Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression *in vitro* biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 64, p. 92– 101, 2016.
- BERGAMASCO, M. D. *et al.* Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 256- 63, 2013.
- BERTRAM, G. *et al.* Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. **Yeast**, v. 12, n. 2, p. 115-27, 1996.
- BHADRA, K.; MAITI, M.; KUMAR, G. S. Molecular recognition of DNA by small molecules: AT base pair specific intercalative binding of cytotoxic plant alkaloid palmatine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 7, p. 1071–1080, 2007.
- BHADRA, K.; MAITI, M.; KUMAR, G. S. DNA-binding cytotoxic alkaloids: comparative study of the energetics of binding of berberine, palmatine, and coralyne. **DNA and cell biology**, v. 27, n. 12, p. 675-85, 2008.
- BHADRA, K.; KUMAR, G. S. Therapeutic otential of nucleic acid- binding isoquinoline alkaloids: binding aspects and implications for drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 31, n. 6, p. 821-862, 2011.
- BIONDI, R. M. VERON, M.; WALZ, K.; PASSERON, S. *Candida albicans* nucleoside-diphosphate kinase: purification and characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 323, n. 1, p. 187-94, 1995.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398- 403, 2013.

BUSH, G. L.; MEYER, D. I. The refolding activity of the yeast heat shock proteins Ssa1 and Ssa2 defines their role in protein translocation. **The Journal of Cell Biology**, v. 135, n. 5, p. 1229-37, 1996.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. *et al.* Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 555- 560, 2013.

CAVALCANTI, B. C. *et al.* Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560–568. 2009.

CAVALCANTI, Bruno Coêlho. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados nor- β - lapachônico: estudos de mecanismo de ação.** 2010. 170f. Tese (doutor em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CHIU, J.; WONG, J. W.; HOGG, P. J. Redox regulation of methionine aminopeptidase 2 activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 21, P. 15035-43, 2014.

CHO, J.; LEE, D. G. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. **Biochimie**, v. 93, n. 10, p. 1873-9, 2011.

CHOI, H.; LEE, D. G. Lycopene induces apoptosis in *Candida albicans* through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. **Biochimie**, v. 115, p. 108-15, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). References methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27-A3, 3rd ed., **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27- S4. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2012.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249- 261, 2004.

COLOMBO, A. L. *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 17, n. 3, p. 283- 312, 2013.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816- 2823, 2006.

CURTY, N. *et al.* Discovering the infectome of human endothelial cells challenged with *Aspergillus fumigatus* applying a mass spectrometry label-free approach. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 126-40, doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.003, 2014.

DA SILVA C. R. *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.

DA SILVA, A. R. *et al.* Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. **antimicrobial agents and chemotherapy**, n. 5, v. 60, 2016.

DA SILVA, C. R. *et al.* Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468- 78, 2014.

DA SILVA, E. N. Jr. *et al.* Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **European Journal Medical Chemical**, v. 46, n. 1, p. 399- 410, 2011.

DENG, Y.; ZHANG, M.; LUO, H. Identification and antimicrobial activity of two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Tinospora capillipes*. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 289- 302, 2012.

DEVEAU, A.; HOGAN, D. A. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. **Methods in Molecular Biology**, 692:219-33. doi: 10.1007/978-1-60761-971-0_16, 2011.

DUMONT, E.; MONARI, A. Interaction of palmatine with DNA: an environmentally controlled phototherapy drug. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 2, p. 410- 9, 2015.

FOCHTMANN, A. *et al.* Predisposing factors for candidemia in patients with major burns. **Burns**, v. 41, n. 2, p. 326-32, 2015.

GALLUZZI, L. *et al.* Mitochondrial gateways to cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 1, p. 1-20, 2010.

GIRHARD, M. *et al.* Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: versatile redox partner for bacterial P450s. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1625-35, 2013.

GONÇALVES, S. S. *et al.* ; SOUZA, A. C.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, doi: 10.1111/myc.12469, 2016.

GRUDNIAK, A. M.; MARKOWSKA, K.; WOLSKA, K. I. Interactions of *Escherichia coli* molecular chaperone HtpG with DnaA replication initiator DNA. **Cell Stress Chaperones**, v. 20, n. 6, p. 951-7, 2015.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002, 2016.

GUO, Q. *et al.* Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 457-462, 2008.

HAMBRIGHT, H. G. *et al.* Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: potential role for rpS6/NFkB/FLIP. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 10, p. 1227–1234, 2015.

HINRICHSEN, S. L. *et al.* *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 325-328, 2009.

HWANG, J. H. *et al.* (+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1784-93, 2012.

HWANG, J. H. *et al.* Hibicuslide C-induced cell death in *Candida albicans* involves apoptosis mechanism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, P. 1400-11, 2014.

IRAQUI, I. *et al.* Peroxiredoxin Tsa1 is the key peroxidase suppressing genome instability and protecting against cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 6, e1000524, 2009.

ISHIKAWA, D. *et al.* Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly. **The Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 5, p. 621-7, 2004.

ISLAM, M. M. *et al.* Binding of DNA-binding alkaloids berberine and palmatine to tRNA and comparison to ethidium: Spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 891, p. 498- 507, 2008.

JIA, F. *et al.* Identification of palmatine as an inhibitor of *West Nile virus*. **Archives of Virology**, v. 155, n. 8, p. 1325-9, 2010.

KATRAGKOU, A.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Invasive fungal infections in pediatric solid organ transplant patients: epidemiology and management. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 2, p. 57- 64, 2015.

KAZAK, E. *et al.* An investigation of *Candida* species isolated from blood cultures during 17 years in a university hospital. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 623- 9, 2014.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Proteomic analysis of proteins released from growth-arrested *Candida albicans* following exposure to caspofungin. **Medical Mycology**, v. 48, n. 4, p. 598-605, 2010.

KHALILI, V. *et al.* Purification and comparison of heat shock protein 90 (Hsp90) in *Candida albicans* isolates from Malaysian and Iranian patients and infected mice. **Journal de Mycologie Médicale**, doi: 10.1016/j.mycmed.2015.12.007, 2016.

KOGURE, T.; TAKAGI, M.; OHTA, A. n-Alkane and clofibrate, a peroxisome proliferator, activate transcription of ALK2 gene encoding cytochrome P450alk2 through distinct cis-acting promoter elements in *Candida maltosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, n. 1, p. 78-86, 2005.

KUMAR, D. *et al.* Candidemia-induced pediatric sepsis and its association with free radicals, nitric oxide, and cytokine level in host. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 2, p. 296- 303, 2015.

LATTIF, A. A. *et al.* The glyoxylate cycle enzyme activities in the pathogenic isolates of *Candida albicans* obtained from HIV/AIDS, diabetic and burn patients. **Mycoses**, v. 4, v. 2, p. 85-90, 2006.

LI, G. Z. *et al.* Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696– 1719, 2009.

LIM, C. S. *et al.* *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21- 31, 2012.

LIU, X. *et al.* Effect of traditional Chinese medicinal herbs on *Candida* spp. from patients with HIV/AIDS. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 1, p. 56- 60, 2011.

LOPEZ, C. M. *et al.* *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e90796. doi: 10.1371/journal.pone.0090796, 2014.

MAK, S. *et al.* Synergistic inhibition on acetylcholinesterase by the combination of berberine and palmatine originally. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 511-516, 2014.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MARTINS, N. *et al.* *In vitro* anti-*Candida* activity of *Glycyrrhiza glabra* L. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 81-85, 2016.

MATTHAIYOU, D. K.; CHRISTODOULOPOULOU, T.; DIMOLOPOULOS, G. How to treat fungal infections in ICU patients. **BMC Infectious Diseases**, 15:205. doi: 10.1186/s12879-015-0934-8, 2015.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119- 28, 2013.

MCDONOUGH, J. A. *et al.* Involvement of *Candida albicans* NADH dehydrogenase complex I in filamentation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, n. 2, p. 117-27, 2002.

MEDRANO, D. J. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17- 20, 2006.

- MELO, N. R. *et al.* HIV-1 anti-retroviral drug effect on the *C. albicans* hyphal growth rate by a Bio-Cell Tracer system. **Braz. J. Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 225-229, 2006.
- MI, R. *et al.* Binding properties of palmatine to DNA: spectroscopic and molecular modeling investigations. **Luminescence**, v. 30, n. 8, p. 1344–1351, 2015.
- MILOSHEY, G.; MIHAYLOY, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v. 513, n. 1-2, p. 69- 74. 2002.
- NETO, J. B. A. *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5: e93698, doi: 10.1371/journal.pone.0093698, 2014.
- NEVES-JUNIOR, A. *et al.* Prevalence and fluconazole susceptibility profile of *Candida* spp. clinical isolates in a brazilian tertiary hospital in minas gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, 2 Suppl, p. 1349- 59, 2015.
- NKWENGOUA, E. T. *et al.* *In vitro* inhibitory effects of palmatine from *Enantia chlorantha* on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 12, p. 1144- 1150, 2009.
- NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561- 570, 2010.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.
- OLIVEIRA, A. S. *et al.* Anti-*Candida* activity of fluoxetine alone and combined with fluconazole: a synergistic action against fluconazole- resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 4224- 6, 2014.
- PARK, K. S. *et al.* Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in *Candida albicans*. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 667–674, 1999.
- PFALLER, M. A. *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. **PLoS One**, v. 9, n. 7, e101510. doi: 10.1371/journal.pone.0101510, 2014.
- PIERCE, C. G. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NIH Public Access**, v. 3, n. 9, p. 1494– 1500, 2008.
- PIERCE, C. G. *et al.* From biology to drug development: new approaches to combat the threat of fungal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 3. n. 3, doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0007-2014, 2015.

PIRES, Regina Helena. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise.** 2010. 172f. Tese (doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia)- Universidade Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

PUSTOVIDKO, A. V. *et al.* Derivatives of the cationic plant alkaloids berberine and palmatine amplify protonophorous activity of fatty acids in model membranes and mitochondria. **Mitochondrion**, v. 13, n. 5, p. 520-5, 2013.

QI, H. *et al.* Comparative study of antimicrobial effects of three chinese medicinal herbs containing protoberberine alkaloids. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 3, p. 335- 9, 2013.

RANE, H. S. *et al.* Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 428- 36, 2014.

SANTOLAYA, M. E. *et al.* Active surveillance of candidemia in children from Latin America: a key requirement for improving disease outcome. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, e40-4. doi: 10.1097/INF.0000000000000039. e40- 4, 2014.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-90, 2008.

SHAHID, S. K. Newer patents in antimycotic therapy. **Pharmaceutical patent analyst**, v. 5, n. 2, p. 115-134, 2016.

SHE, X. *et al.* Cell wall n-linked mannoprotein biosynthesis requires goalp, a putative regulator of mitochondrial complex i in *candida albicans*. **PLoS One**, v. 11, n. 1, e0147175. doi: 10.1371/journal.pone.0147175, 2016.

SIFUENTES-OSORNIO, J. *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in latin america current managment of fungal infections. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23– 34, 2012.

SILVA, J. C. *et al.* Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell*. **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144–56, 2006.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2 p. 288– 305, 2012.

SLOBODNIKOVA, L. *et al.* Antimicrobial activity of *Mahonia aquifolium* crude extract and its major isolated alkaloids. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 674-6, 2004.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; ŻUKOWSKI, K.; CHUDY, M. Quantification of the APE2 gene expression level in *Candida albicans* clinical isolates from patients with diagnosed fungal infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 7, p. 1429- 35, 2015.

STORTI, L. R. *et al.* *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 225- 231, 2012.

SUN, L.; LIAO, K.; WANG, D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 10, n. 2, e0117695, 2015.

SUN, N. *et al.* Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 532-42, 2013.

SUNDARARAMAN, M. *et al.* 1-alkyl-(N, N-dimethylamino)pyridinium bromides: inhibitory effect on virulence factors of *Candida albicans* and on the growth of bacterial pathogens. **Journal Medical Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 241-8, 2013.

SUNDSTROM, P.; SMITH, D.; SYPHERD, P. S. Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 4, p. 2036-45, 1990.

TABBENE, O. *et al.* Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 2, p. 289- 300, 2016.

THEBERGE, S. *et al.* *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. **BMC Microbiology**, v. 13, 246–259, 2013.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. **Biochimie**, v. 84, n. 2-3, p. 187-93, 2002.

VALENTÍN, A. *et al.* Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2418- 23, 2012.

WEIDS, A. J.; GRANT, C. M. The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress. **Journal Cell Science**, v. 127, p. 1327-35, 2014.

WILLE, M. P. *et al.* Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 288- 292, 2013.

XIAO, C. W. *et al.* Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against *Microsporum canis* -induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 177, doi: 10.1186/s12906-015-0680-x, 2015.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95- 105, 2014.

YOO, J. I. *et al.* Proteomic analysis of intracellular and membrane proteins from voriconazole-resistant *Candida glabrata*. **Osong Public Health Research Perspectives**, v. 4, n. 6, p. 293- 300, 2013.

YU, H. *et al.* Assessing the potential of four cathelicidins for the management of mouse candidiasis and *Candida albicans* biofilms. **Biochimie**, v. 121, p. 268- 77, 2016.

YU, L. H. *et al.* Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 770-5, 2012.

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355-73, 2015.

ZHANG, L. *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of 13-n-alkyl berberine and palmatine analogues as anticancer agents. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11294-302, 2012.

ANEXOS

Tabela I- Efeito antifúngico da palmatina contra cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Cepa ^a	Origem	Nº Genbank	CIM			
			Valores de CIM ^b (µg/mL)			
			Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Palmatina
<i>C. albicans</i> 71***	Sangue	KJ740179	64	4	2	64
<i>C. albicans</i> 105	Sangue	KJ740175	32	0,25	2	64
<i>C. albicans</i> */** 278	Sangue	AB861478	32	4	0,03	64
<i>C. albicans</i> 289	Sangue	KJ740176	64	4	2	64
<i>C. albicans</i> 442	Sangue	KJ740174	64	4	1	64
<i>C. albicans</i> 938	Sangue	AB861479	32	0,25	2	128
<i>C.parapsilosis</i> 43	Sangue	KJ740188	32	4	0,125	32
<i>C. parapsilosis</i> 158	Sangue	AB861485	16	1	0,125	64
<i>C.parapsilosis</i> 271	Sangue	KJ740191	16	2	0,25	32
<i>C. parapsilosis</i> ** 356	Sangue	KJ740186	64	4	0,125	32
<i>C. parapsilosis</i> 1154	Sangue	AB861488	8	1	0,125	128
<i>C. parapsilosis</i> N5	Sangue	AB861486	64	16	0,5	80,6
<i>C. parapsilosis</i> 1980	Sangue	AB861487	32	0,25	1	101,6
<i>C.tropicalis</i> ** 23	Sangue	AB861490	32	2	1	64
<i>C.tropicalis</i> 72	Sangue	KJ740181	64	8	2	64
<i>C.tropicalis</i> 180	Urina	AB861491	32	0,25	0,25	64
<i>C.tropicalis</i> 574	Sangue	KJ740185	64	2	1	64
<i>C.tropicalis</i> 716	Sangue	AB861493	16	0,25	1	50,8
<i>C.tropicalis</i> T4	Sangue	KF616840	64	1	0,25	64
<i>C. glabrata</i> 312	Sangue	AB861484	64	4	1	64

<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-	2	0,25	0,125	32
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	-	-	16	0,25	0,25	64

^a Cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

^b O CIM foi definido como a menor concentração da fármaco que produziu 50 % de redução de crescimento fúngico após 24 h de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-S4 do CLSI. Os valores do CIM são expressos em µg/ mL. O CIM representa a média geométrica de 3 CIM determinados em diferentes dias.

* Cepa representativa utilizada para investigar o mecanismo de ação da palmatina.

** Cepas utilizadas para o teste do biofilme.

*** Cepa utilizada para a proteômica.

ANEXOS

Tabela II- Efeito da palmatina sobre a densidade celular em *C. albicans* resistente azólicos em diferentes intervalos de tempo

Densidade Celular				
Tratamento	Média (10⁶ Células/ mL) ± EPM			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle (-)	1,107 ± 0,041	1,333 ± 0,020	1,547 ± 0,023	1,860 ± 0,055
ANFO B	1,097 ± 0,034*	1,007 ± 0,043*	0,647 ± 0,033*	0,307 ± 0,020*
CIM	0,987 ± 0,035	1,083 ± 0,041*	1,233 ± 0,015*	1,087 ± 0,032*
2x CIM	1,040 ± 0,075	1,003 ± 0,024*	0,867 ± 0,023*	0,831 ± 0,019*
4x CIM	0,867 ± 0,058*	0,620 ± 0,026*	0,433 ± 0,018*	0,373 ± 0,023*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Tabela III- Efeito da palmatina sobre a despolarização mitocondrial em *C. albicans* resistente azólicos em diferentes intervalos de tempo

Despolarização mitocondrial				
Tratamento	Média (%) ± EPM			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle (-)	2,723 ± 0,026	2,723 ± 0,087	2,087 ± 0,018	4,270 ± 0,585
ANFO B	4,573 ± 0,431*	16,647 ± 1,771*	38,533 ± 1,446*	45,690 ± 4,294*
CIM	6,567 ± 0,174*	14,220 ± 1,010*	19,080 ± 0,609*	22,097 ± 3,659*
2x CIM	12,827 ± 0,948*	17,063 ± 0,998*	27,653 ± 0,603*	37,513 ± 4,374*
4x CIM	17,483 ± 0,870*	23,333 ± 0,895*	30,937 ± 4,482*	53,997 ± 2,553*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

ANEXOS

Tabela IV- Efeito da palmatina na produção de espécies reativas de oxigênio em *C. albicans* resistente azólicos em diferentes intervalos de tempo

Espécies reativas de oxigênio				
Tratamento	Média (%) ± EPM			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle (-)	1,407 ± 0,023	1,310 ± 0,015	1,410 ± 0,046	1,860 ± 0,055
ANFO B	1,813 ± 0,302*	10,407 ± 1,511*	14,677 ± 1,022*	16,867 ± 0,742*
CIM	1,413 ± 0,020	1,347 ± 0,026	1,390 ± 0,026	1,087 ± 0,032
2x CIM	1,377 ± 0,029	1,390 ± 0,015	1,403 ± 0,03	0,831 ± 0,019
4x CIM	1,387 ± 0,024	1,360 ± 0,025	1,387 ± 0,027	0,373 ± 0,023*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Tabela V- Efeito da palmatina na externalização de fosfatidilserina em *C. albicans* resistente azólicos em diferentes intervalos de tempo

Células com fosfatidilserina externalizadas				
Tratamento	Média (%) ± EPM			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle (-)	3,107 ± 0,223	3,320 ± 0,032	3,32 ± 0,032	4,183 ± 0,489
ANFO B	5,217 ± 1,034*	23,847 ± 3,058*	23,847 ± 3,058*	66,533 ± 0,884*
CIM	6,620 ± 0,284*	15,890 ± 0,956*	15,890 ± 0,956*	48,177 ± 2,539*
2x CIM	8,073 ± 0,133*	22,980 ± 2,002*	22,980 ± 2,002*	50,130 ± 0,148*
4x CIM	15,113 ± 0,638*	32,250 ± 1,202*	32,250 ± 1,202*	61,120 ± 3,382*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

ANEXOS

Tabela VI- Danos ao DNA provocados por palmatina na presença e ausência da enzima FPG em *C. albicans* resistente azólicos em diferentes intervalos de tempo

Danos ao DNA		
Tratamento	Média (índice de dano) ± EPM	
	FPG (-)	FPG (+)
Controle (-)	11,667 ± 1,667	9,500 ± 1,335
ANFO B	125,667 ± 3,896*	173,000 ± 4,058*
CIM	49,167 ± 2,301*	41,333 ± 2,171*
2x CIM	68,167 ± 2,713*	61,500 ± 2,655*
4x CIM	101,667 ± 5,643*	99,667 ± 4,137*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

ANEXOS

Tabela VII- Redução da viabilidade do biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* após ser exposto a concentrações inibitórias e subinibitórias da palmatina

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm EPM (n= 3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Controle (-)	100	100	100
8	-	-	98,42 \pm 0,78
16	99,98 \pm 0,36	98,78 \pm 2,04	99,49 \pm 1,58
32	97,36 \pm 0,62	94,70 \pm 0,25	96,28 \pm 0,33
64	96,04 \pm 0,15	93,37 \pm 0,37	95,44 \pm 0,31
128	89,03 \pm 0,68*	86,41 \pm 0,45*	84,21 \pm 1,94*
256	83,63 \pm 0,21*	68,38 \pm 5,24*	50,96 \pm 2,93*
640	70,46 \pm 0,49*	56,00 \pm 1,84*	38,42 \pm 2,05*
1280	53,79 \pm 0,71*	56,17 \pm 1,62*	-

Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Tabela VIII- Redução da viabilidade do biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* após ser exposto a uma faixa de concentração de anfotericina B

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm EPM (n= 3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Controle (-)	100	100	100
0,03	92,22 \pm 0,55*	85,34 \pm 1,66*	73,77 \pm 1,00*
0,06	85,13 \pm 0,55*	84,32 \pm 0,78*	69,78 \pm 4,71*
0,125	71,49 \pm 1,79*	70,41 \pm 1,26*	73,39 \pm 4,78*
0,25	61,81 \pm 1,64*	56,68 \pm 2,01*	69,65 \pm 4,61*
0,5	41,42 \pm 1,41*	48,16 \pm 4,35*	62,12 \pm 1,05*
1	43,77 \pm 1,36*	47,02 \pm 3,38*	53,05 \pm 4,15*
2	34,70 \pm 1,36*	28,51 \pm 1,00*	52,31 \pm 2,00*
4	17,52 \pm 1,45*	15,17 \pm 0,33*	43,92 \pm 3,08*
8	13,68 \pm 1,44*	9,09 \pm 0,83*	35,25 \pm 3,62*
16	9,92 \pm 0,92*	7,95 \pm 0,27*	15,26 \pm 2,41*

Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

ANEXOS

Tabela IX- Inibição da formação do biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* após ser exposto a concentrações inibitórias e subinibitórias da palmatina

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm EPM (n= 3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Controle (-)	100	100	100
8	-	-	68,05 \pm 2,80*
16	74,58 \pm 3,75*	87,89 \pm 2,13*	65,46 \pm 2,75*
32	60,95 \pm 2,33*	82,21 \pm 0,50*	68,43 \pm 3,91*
64	52,48 \pm 1,70*	65,35 \pm 4,17*	53,79 \pm 2,90*
128	48,78 \pm 1,39*	51,01 \pm 4,43*	54,76 \pm 1,17*
256	21,16 \pm 1,66*	34,46 \pm 5,25*	42,62 \pm 2,75*
640	11,88 \pm 1,10*	17,43 \pm 0,50*	9,21 \pm 0,62*
1280	8,48 \pm 1,00*	10,51 \pm 1,23*	-

Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Tabela X- Inibição da formação do biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* após ser exposto a uma faixa de concentração de anfotericina B

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm EPM (n= 3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Controle (-)	100	100	100
0,03	92,22 \pm 0,56*	24,47 \pm 0,87*	35,61 \pm 2,11*
0,06	85,13 \pm 0,56*	19,67 \pm 1,04*	24,47 \pm 2,64*
0,125	71,49 \pm 1,79*	18,25 \pm 1,12 *	25,68 \pm 1,32*
0,25	61,81 \pm 1,64*	7,84 \pm 0,57*	18,49 \pm 1,85*
0,5	41,42 \pm 1,41*	5,03 \pm 0,58*	11,69 \pm 0,95*
1	43,77 \pm 1,36*	5,53 \pm 0,27*	5,28 \pm 0,55*
2	34,70 \pm 1,36*	5,16 \pm 0,26*	6,21 \pm 0,76*
4	17,52 \pm 1,45*	5,53 \pm 0,35*	5,37 \pm 1,21*
8	13,68 \pm 1,44*	4,88 \pm 0,10*	6,92 \pm 1,10*
16	9,92 \pm 0,92*	5,03 \pm 0,40*	5,40 \pm 1,18*

Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

APÊNDICE

Antifungal activity of palmatine against strains of *Candida* spp resistant to azoles in planktonic cells and biofilm

Rosana de Sousa Campos^{1,2}, Cecília Rocha da Silva^{1,7}, João Batista de Andrade Neto^{1,2},
Letícia Serpa Sampaio^{1,2}, Francisca Bruna Stefany Aires do Nascimento^{1,2}, Maria Aparecida
da Silva Josino^{1,2}, Manoel O. de Moraes³, Bruno Coêlho Cavalcanti³, Hemerson Iury Ferreira
Magalhães⁴, Akenaton Onassis Cardoso Viana Gomes⁵, Marina Duarte Pinto Lobo⁶ and
Hélio Vitoriano Nobre Júnior^{1,2}

*1. Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of
Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL), Federal University of Ceará, Fortaleza,
CE, Brazil;*

*2. Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of
Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;*

*3. Department of Physiology and Pharmacology, Neuropharmacology Laboratory, Federal
University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;*

4. School of Pharmacy, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil;

*5. Department Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza,
CE, Brazil;*

6. School of Pharmacy, University of Fortaleza, CE, Brazil

7. UNICHRISTUS, Christus University Center, CE, BRAZIL

Corresponding author:

Telephone number: # 55 85 3366 8274

Fax: # 55 85 3366 8257

E-mail: label_ufc@yahoo.com.br

RESUMO

A incidência das infecções fúngicas vem aumentando e as causadas por espécies do gênero *Candida* ocupam uma posição de destaque. Devido ao aumento dessas infecções juntamente com o problema da resistência e a escassez de fármacos antifúngicos, faz-se necessária à busca por novos antifúngicos que tenham ação também em cepas resistentes. Neste contexto, a palmatina, um alcalóide protoberberina, merece destaque por suas várias propriedades farmacológicas, inclusive antifúngicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da palmatina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos em células planctônicas e biofilme e elucidar o possível mecanismo de morte celular através das técnicas de citometria de fluxo e ensaio do cometa. A palmatina demonstrou atividade antifúngica com os CIM variando de 32 a 128 µg/mL. Em biofilmes formados, a palmatina reduziu em 50% a viabilidade celular na concentração de 20x CIM (*C. albicans*) e 10x CIM (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Já em biofilmes em formação, a mesma porcentagem de inibição foi alcançada na concentração do CIM (*C. albicans*) e 2x CIM (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Verificou-se que a palmatina causa danos ao DNA, promove despolarização mitocondrial, reduzindo a densidade celular e aumentando a externalização de fosfatidilserina, sugerindo morte celular por apoptose. A ação antifúngica da palmatina em *Candida* spp. resistentes a azólicos na forma planctônica e em biofilme formados e em formação, assim como, ao fato de não ter apresentado citotoxicidade em células de mamíferos, aponta para uma promissora nova molécula anticandida.

Palavras-chave: *Candida* spp, palmatina, biofilme, citometria de fluxo, ensaio do cometa.

ABSTRACT

The incidence of fungal infections has increased. Infections caused by *Candida* species occupy a prominent position. Due to the increase in these infections and the problem of resistance and lack of antifungal drugs, it is necessary to seek new antifungals that also act against resistant strains. In this context, palmatine is a protoberberine alkaloid noteworthy for its various pharmacological properties, including antifungal properties. The objective of this study was to evaluate the activity of palmatine against *Candida* spp. strains resistant to azole in planktonic cells and biofilm, and to elucidate the possible mechanism of cell death using flow cytometry and comet assay. Palmatine showed an antifungal activity with MICs ranging from 32 to 128 mg/mL. In the formed biofilms, palmatine reduced by 50% cell viability at the concentration of 20x MIC (*C. albicans*) and 10x MIC (*C. tropicalis* and *C. parapsilosis*). In the formed biofilms, the same percentage of inhibition was achieved at a concentration of 1x MIC (*C. albicans*) and 2x MIC (*C. tropicalis* and *C. parapsilosis*). It was found that palmatine causes damage to DNA, promotes mitochondrial depolarization by reducing cell density and increasing the externalization of phosphatidylserine, suggesting cell death by apoptosis. The antifungal action of palmatine in *Candida* spp. resistant to azoles in planktonic cells and biofilm formed and in formation, as well as the fact of not having presented cytotoxicity in mammalian cells, point to a promising new anti-candida molecule.

Keywords: *Candida* spp., palmatine, biofilm, flow cytometry, comet assay.