



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
CURSO DE FARMÁCIA

LETÍCIA SERPA SAMPAIO

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BERBERINA
FRENTE À CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL

FORTALEZA

2015

LETÍCIA SERPA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BERBERINA
FRENTE À CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Co-Orientadora: Ma. Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S184a Sampaio, Letícia Serpa.
Avaliação in vitro da atividade antifúngica da berberina frente à cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol/ Letícia Serpa Sampaio. – 2015.
41 f.: il. color., enc. ; 30 cm.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.
Co-Orientação: Ma. Cecília Rocha da Silva.
1. Candida. 2. Fluconazol. 3. Berberina. 4. Citometria de Fluxo. 5. Morte Celular. I. Título.

CDD 615.12

LETÍCIA SERPA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BERBERINA
FRENTE À CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A Deus.

Aos meus pais, Vinício e Regina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por tanto cuidado que dedica a mim, renovando a cada dia Suas promessas, ensinando-me a ver o mundo com os Seus olhos, mostrando-me que a vida vai muito além do que se vê e que mais importante que a certeza que tanto esperamos são passos dados e o caminho percorrido.

Aos meus pais, pelo mais próximo exemplo da Sagrada Família que levo comigo, por tanto amor dedicado a mim, aos meus irmãos e ao próximo, pelos conselhos oferecidos, pela paciência dedicada e pelo modo que tornaram mais leve esse processo de conclusão do curso.

Aos meus irmãos, Eduardo e Gabriella, os meus maiores exemplos de determinação na vida profissional, pelo companheirismo e paciência durante esse período e durante a minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela confiança, dedicação e disponibilidade, por nos proporcionar além de conhecimento, também valores que são fundamentais na nossa caminhada e crescimento profissional.

À minha co-orientadora, Ma. Cecília Rocha da Silva, pela disponibilidade em ensinar desde o primeiro dia que entrei no LABEL, por todo o apoio e dedicação oferecidos durante essa etapa. Por toda a contribuição dada a esse trabalho e a minha formação acadêmica.

Ao Dr. Bruno Coelho Cavalcanti, pela colaboração na realização do trabalho.

Aos amigos do LABEL, João Batista, Rosana Campos, Bruna Nascimento, Rose Anny, Daniel Rodrigues, Anderson Ramos e Aparecida Josino, equipe pela qual eu tenho um grande respeito e admiração, por toda a ajuda e disponibilidade, por tornarem o trabalho mais agradável com presença de vocês.

Às minhas amigas, futuras Farmacêuticas, Aline, Hilmará, Rayanne, Erika, Giovanna e Nara, por terem tornando todos esses anos mais leves e agradáveis, por todas as conversas, reflexões, risos, apoio que foram partilhados durante esse tempo e que possivelmente continuaremos partilhando. Por tudo que eu pude aprender com cada uma, levarei isso por toda a minha vida.

Ao meu namorado, Lucas, que trouxe a paz aos dias mais agitados da faculdade, a alegria aos dias tristes e esperança aos dias mais confusos. Por todo o seu companheirismo e dedicação em me fazer feliz.

Aos meus amigos de caminhada, que me levam para mais perto de Deus, intercedem por mim e intercederam por esses anos de graduação. Por serem esse canal tão bonito para Deus e por me ensinarem que temos sempre o que aprender com o nosso próximo.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pelas oportunidades adquiridas.

Enfim, de modo geral, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta realização profissional e pessoal.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

Dentre os fungos patogênicos, os do gênero *Candida* são os mais comuns para os seres humanos e a candidíase vem sendo cada vez mais notificada em pacientes imuno deficientes. Nos dias atuais temos observado e vivenciado um aumento de infecções fúngicas invasivas. No entanto, as drogas antifúngicas como fluconazol perderam a sua eficácia devido à resistência antifúngica, fazendo com que se buscassem novas estratégias terapêuticas. Devido a isto, os produtos naturais surgem como sendo uma nova fonte para se obter compostos com atividades antifúngicas, merecendo destaque a berberina. A avaliação do efeito antifúngico foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (M27-A3) e por meio de técnicas de citometria de fluxo, onde também avaliamos o provável mecanismo de ação desse composto. Os isolados utilizados no estudo pertencem ao Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL) da UFC. Das cepas avaliadas, todas apresentaram sensibilidade a berberina. Os ensaios realizados mostraram que tratamento com berberina levou as células de *Candida albicans* à morte celular por apoptose. Os dados apresentados neste estudo colaboram para que no futuro a berberina possa ser usada como agente antifúngico para tratamento de candidemias, entretanto um maior número de cepas e testes são necessários para confirmar esses achados.

Palavras-chave: gênero *Candida*. Resistência ao Fluconazol. Berberina. Atividade Antifúngica. Citometria de Fluxo. Morte celular.

ABSTRACT

Among the pathogenic fungi, of the genus *Candida* are the most common to humans and candidiasis has been increasingly reported in immune deficient patients. Nowadays, we have observed and experienced an increase of invasive fungal infections. However, antifungal drugs such as fluconazole lost its effectiveness due to the antifungal resistance, causing it to seek new therapeutic strategies. Due to this, natural products emerge as a new source for obtaining compounds with antifungal activity deserves special mention berberine. The evaluation of the antifungal effect was determined by the microdilution broth method (M27-A3) and flow cytometric techniques which assess the probable mechanism of action of that compound. The strains used in the study belong to Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL) of the UFC. All of evaluated strains showed sensitivity to berberine. The tests showed that treatment with berberine led cells of *Candida albicans* to cell death by apoptosis. Data presented in this study to collaborate in the future berberine can be used as an antifungal agent for treating candidemias, though a larger number of strains and tests are needed to confirm these findings.

Keywords: genus *Candida*. Fluconazol Resistance. Berberine. Antifungal Effect. Flow Cytometry. Cell Death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da berberina.....	19
Figura 2- Plantação de <i>Coptis chinensis</i> na cidade de Chongqing, China.....	20
Figura 3- Redução do número de células viáveis tratadas com o composto berberina (CIM, 2xCIM, 4xCIM) em cepa de <i>Candida albicans</i> resistente ao FLC após 24 horas de exposição.....	27
Figura 4- Avaliação da integridade de membrana determinada pelo ensaio de exclusão por iodeto de propídeo (PI) (A), em cepas de <i>Candida albicans</i> resistente ao FLC tratadas com a berberina (CIM, 2xCIM, 4xCIM), por um período de 24 horas (B).....	28
Figura 5- Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de <i>Candida albicans</i> resistente ao FLC tratadas com berberina (CIM, 2xCIM, 4xCIM) por um período de 24 horas.....	28
Figura 6- Externalização da fosfatidilserina pela marcação com anexina V em células de <i>C.albicans</i> resistente ao fluconazol tratada com berberina em diferentes concentrações (CIM, 2xCIM, 4xCIM) após 24 horas de exposição.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela1- Efeito antifúngico da Berberina frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol.....	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$ – Potencial transmembrana mitocondrial

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BBR – Berberina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

FITC- Fluoresceína

FLC – Fluconazol

LABEL – Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

MOPS – Ácido morfolinopropanosulfônico

IP – Iodeto de propídio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Infecções Fúngicas	15
1.2	Fatores de Virulência e Patogenicidade	16
1.3	Arsenal Farmacológico para o Tratamento Antifúngico	17
1.4	Resistência ao Fluconazol	18
1.5	Importância dos Recursos Naturais como Possíveis Fontes de Obtenção de Novos Fármacos.....	19
1.6	Berberina	20
2	PERGUNTAS DE PARTIDA	22
3	HIPÓTESES.....	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	Objetivo Geral	23
4.2	Objetivos específicos.....	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
6	RESULTADOS.....	27
7	DISCUSSÃO	31
8	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Fúngicas

Nas últimas décadas são notáveis os avanços na tecnologia médica, como a introdução de métodos diagnósticos mais eficientes, complexas técnicas cirúrgicas, eficientes antibióticos e quimioterápicos. Como resultado, percebe-se uma notável melhora na qualidade de vida e sobrevida de pacientes hospitalizados (SILVA *et al.*, 2012; KOTHAVADE *et al.*, 2010). Em contrapartida, microrganismos oportunistas, em especial os fungos, tornaram-se mais patogênicos e resistentes, resultando em infecções de relevante importância clínica (NEUFELD *et al.*, 2009).

Dentre os fungos patogênicos, os do gênero *Candida* são os mais comuns para os seres humanos (LIONAKIS e NETEA, 2013) e causam um espectro de infecções que variam de candidíase superficial de pele e mucosa a infecções mais graves que ameaçam a vida. O termo candidíase invasiva compreende uma grande variedade de desordens graves que incluem a candidemia, candidíase disseminada, endocardite, meningite, endoftalmite e envolvimento de outros órgãos profundos (PAPPAS, 2006).

A incidência de infecções invasivas causadas por *Candida* spp. está relacionada a alguns fatores de risco, como: uso mais frequente de cateteres intravenosos, administração prévia de antibióticos de amplo espectro, nutrição parenteral, terapia imunossupressora, transplantes de órgãos sólidos e procedimentos invasivos (MAYR; AIGNER; LASS-FLÖRL, 2011). Essas infecções ameaçam seriamente a saúde de pacientes hospitalizados, causando elevada morbidade e mortalidade, prolongando a permanência do paciente no hospital, aumentando assim os custos hospitalares (PFALLER e DIEKEMA, 2007; ARNOLD *et al.*, 2010; SARABAH *et al.*, 2012). Por exemplo, Min, Curtis e Baddley (2013) avaliaram o custo médio para o tratamento total de cada paciente com candidíase invasiva, tendo como base mais de 500 hospitais nos Estados Unidos e incluindo no estudo 7170 pacientes que receberam o tratamento no período de Outubro de 2004 à Setembro de 2005, e concluíram que o custo médio foi de 44482 dólares/ paciente (em 2005). Desse modo, Candidíase invasiva tem emergido como um importante problema de saúde pública (MCNEIL *et al.*, 2001, PFALLER e DIEKEMA, 2007).

As espécies do gênero *Candida* são responsáveis por 80% das infecções fúngicas humanas (ALANGADEN, 2011; PFALLER *et al.*, 2012b). Mais de 90% das candidemias

invasivas são atribuídas a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER e DIEKEMA, 2007).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* continua a espécie predominante na maioria dos estudos, com incidências que variam de 11,5% na Turquia, 32% no México e Taiwan para mais de 60% na Áustria e na Suécia (QUINDÓS, 2014). Sabe-se que há notáveis diferenças geográficas na epidemiologia da incidência de candidíase (GUO *et al.*, 2013). Valendo assim ressaltar que, em muitos estudos epidemiológicos, um aumento na incidência de *Candida* não-*albicans* tem sido relatada (MONTAGNA *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Da Costa *et al.* (2014), foram avaliadas todas as amostras de sangue obtidas de pacientes com candidemia internados no Hospital Universitário de Londrina (HU), no período de Janeiro de 2006 a Dezembro de 2007 e Janeiro de 2010 para Dezembro de 2011. Foi concluído que de 108 episódios de candidemia, 71,3% foram causadas por *Candida* não-*albicans*. As duas espécies mais frequentes foram *C. tropicalis* (30,5%) e *C. albicans* (28,7%), seguidas por *C. parapsilosis* (24,1%), *C. glabrata* (8,3%), *C. krusei* (1,8%) e outras espécies (6,6%).

Um estudo prospectivo realizado por Nucci *et al.* (2013), no período de 2008 a 2010, avaliou a incidência de candidemia em 20 hospitais de sete países da América Latina. Esse estudo mostrou incidência de 1,18 episódios por 1000 admissões hospitalares. Os países apresentaram grande variação, sendo observada maior incidência na Colômbia (1,96 episódios por 1000 admissões) e menor no Chile (0,33 episódios por 1000 admissões). O Brasil apresentou 1,38 episódios em 1000 admissões, e os principais agentes foram *Candida albicans* (40,5%), *C. parapsilosis* (25,8%) e *C. tropicalis* (13,2%).

1.2 Fatores de Virulência e Patogenicidade

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições (TAMURA *et al.*, 2007).

Fungos do gênero *Candida* são microrganismos comensais que podem se tornar patogênicos para o ser humano se o equilíbrio da microbiota for perturbado. A patogenicidade dependerá de fatores como a predisposição do hospedeiro (imunodepressão), carga parasitária e virulência dos fungos que facilitam a invasão ao tecido e driblam os mecanismos de defesa do hospedeiro (BARBEDO e SGARBI, 2010; YING e CHUNYANG, 2012; D'EÇA

JÚNIOR, 2011). Espécies do gênero *Candida* apresentam determinados fatores de virulência, tais como a capacidade de escapar das defesas do hospedeiro, a adesão, a formação de biofilme (no tecido hospedeiro e sobre dispositivos médicos) e a produção de enzimas hidrolíticas tais como proteases, fosfolipases e hemolisinas (SILVA *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por De Freitas *et al.*(2014), avaliou a capacidade de determinadas cepas de *Candida* spp. em formar biofilme, para isso foram utilizadas 90 amostras de leveduras, entre elas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, de pacientes hospitalizados com candidúria em Maringá, Brasil. Nos experimentos realizados, os isolados de *C. tropicalis* apresentaram estatisticamente maior capacidade de formar biofilmes (91,7%) do que *C. albicans* (82,5%) e *C. glabrata* (61,3%), a capacidade de formar biofilme é interessante para os microorganismos por conta de alterações metabólicas, redução da sua taxa de crescimento celular, expressão de genes de resistência e presença de uma matriz extracelular por eles expressados, o que garante maior sobrevivência no hospedeiro.

1.3 Arsenal Farmacológico para o Tratamento Antifúngico

Os antifúngicos para o tratamento de candidíase incluem polienos (anfotericina B, anfotericina B lipossomal), triazóis (fluconazol e, itraconazol, voriconazol, posaconazol), equinocandinas(caspofungina, anidulafungina, micafungina) e flucitosina (MATTHAIIOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOPOULOS, 2015). Polienos, azóis e equinocandinas têm mecanismos distintos de ação, e diferentes alvos como a parede ou membrana celular fúngica (CHANDRASEKAR, 2011).

Os polienos foram introduzidos na década de 1950 e representam a classe mais antiga de medicamentos antifúngicos. Muitos polienos têm sido isolados a partir de *Streptomyces* spp. no entanto, apenas a anfotericina B e a nistatina permanecem em uso clínico (CHANDRASEKAR, 2011). A atividade biológica da anfotericina B é mediada através da sua ligação ao ergosterol, um componente essencial da membrana citoplasmática fúngica. Embora tenha 10 vezes mais afinidade por este esterol, também pode ligar-se ao colesterol da membrana celular humana, causando a toxicidade, limitando assim seu uso (MATHEW e NATH, 2009; ORTEGA *et al.*, 2010).

Fluoropirimidinas, das quais apenas 5-fluorocitosina (5-FC) e 5-fluorouracilo (5-FU) são utilizadas na medicina humana, são análogos estruturais sintéticos do nucleotídeo citosina do DNA. Em 1963, foi descoberto o potencial antifúngico da 5-FC para candidíase. Anos mais tarde, 5-FC foi utilizado com sucesso para o tratamento de candidíase sistêmica. Atua inibindo a síntese protéica (VANDEPUTTE, FERRARI e COSTE, 2012).

Azóis são os antifúngicos mais utilizados na prática clínica e, conseqüentemente, são também a classe mais estudada pela comunidade científica. Os azóis são moléculas orgânicas cíclicas que podem ser divididos em dois grupos: os imidazóis (cetoconazol, miconazol) e os triazóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol) (VANDEPUTTE, FERRARI e COSTE, 2012). Os dois grupos atuam na via de biossíntese do ergosterol por inibição de uma enzima chave, a 14- α -desmetilase do lanosterol. Dessa forma, há a depleção conseguinte de ergosterol, acumulação de precursores e perda da integridade da membrana (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; PFALLER, 2012a).

Há três representantes das equinocandinas atualmente: caspofungina, micafungina e anidulafungina. As equinocandinas são semi-lipopeptídeos sintéticos que atuam através da inibição não-competitiva da β -1,3 glucana sintase, uma enzima responsável para a síntese de β -1,3 glucano, um componente integrante da parede celular de muitas espécies de fungos. Esta classe apresenta resultados promissores no tratamento de candidíase invasiva, principalmente em cepas resistentes ao fluconazol (COLOMBO e VAZQUE, 2015). Caspofungina e amicacina são agentes que proporcionam excelente eficácia clínica em conjunto e com baixa toxicidade para o tratamento de infecções graves por *Candida* spp. (PFALLER e DIEKEMA, 2007).

Um estudo realizado por Ferreira *et al.* (2014), no período de 2005 a 2012 em um Hospital da França, concluiu que a caspofungina e fluconazol foram os dois antifúngicos comumente usados no período do estudo. Havendo um aumento significativo na média do consumo de caspofungina ao longo dos anos, enquanto a média do consumo de fluconazol diminuiu. A utilização de anfotericina B ou voriconazol foi escassa e variou muito de um ano para o outro.

1.4 Resistência ao Fluconazol

A resistência aos antifúngicos ocorre quando os isolados não são inibidos por concentrações normalmente utilizadas no esquema terapêutico ou quando eles demonstram CIM que caem em intervalos susceptíveis aos mecanismos de resistência e eficácia clínica contra o isolado não tenha sido demonstrada em estudos confiáveis (PFALLER, 2012a).

O antifúngico mais prescrito mundialmente é o fluconazol. Este antifúngico corresponde a um tratamento eficaz e barato para candidíase invasiva e é o tratamento recomendado para a maioria das infecções. Devido à pressão seletiva causada pelo uso dessa droga, seja de forma profilática ou empírica, atrelado a ampla variedade de espécies que

respondem de forma diferente aos medicamentos de combate, frequentemente, atribuiu-se a resistência de *Candida* spp. aos azólicos (SANTOS *et al.*, 2005).

Resistência adquirida ao fluconazol e outros azóis parece estar aumentando entre os isolados clínicos de *C. tropicalis*, com intervalos de 7% na Dinamarca (ARENDRUP *et al.*, 2011) a 40% no Japão (CHONG *et al.*, 2012). Em uma pesquisa recente de *Candida* não-*albicans* isolados de pacientes com infecções fúngicas invasivas, nos Estados Unidos, a resistência ao fluconazol entre isolados de *C. tropicalis*, abrangendo os anos 2006 a 2011 variou de 2,4% na região Norte para 4,8% na região Oeste (PFALLER *et al.*, 2014). Nesse levantamento, resistência cruzada entre fluconazol, posaconazol e voriconazol foi detectada em *C. tropicalis* isoladas de todo os Estados Unidos.

Mecanismos de resistência a azóis são variados e podem ser divididos em quatro grupos principais: alteração do alvo (lanosterol 14-alfa-desmetilase), mutação do gene que codifica para esta enzima, superprodução do alvo, efluxo extracelular pela superprodução de bombas de efluxo e alteração em outras etapas durante a biossíntese do ergosterol (DANNAOUI, 2013).

No estudo realizado por Castanheira *et al.* (2014), foram avaliadas 1717 isolados de pacientes com infecções fúngicas invasivas, sendo 1487 isolados de *Candida* spp., de 72 Laboratórios da América do Norte, América Latina e Ásia no ano de 2012. A resistência às equinocandinas não foi detectada entre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas de todas as três regiões geográficas. Resistência à anidulafungina (2,1%), caspofungina (3,1%), a micafungina (2,1%) e os triazóis (6,2-15,6%) foi mais proeminente entre isolados de *C. glabrata* na América do Norte. Na América Latina, 1,2% dos isolados de *C. albicans* e 7,2% de *C. parapsilosis* apresentaram resistência ao fluconazol.

1.5 Importância dos Recursos Naturais como Possíveis Fontes de Obtenção de Novos

Fármacos

Sabe-se que por conta do arsenal limitado de agentes antifúngicos disponíveis em caso de falha terapêutica, a possibilidade de expandir a resistência aos agentes antifúngicos em *Candida* spp. tem se tornado um motivo de preocupação (KARACAER *et al.*, 2014). De modo que mais agentes anti-*Candida* com baixa toxicidade e alta eficiência tem sido urgentemente necessários (TOBUDIC *et al.*, 2012).

Cada vez mais, os produtos naturais de plantas vêm atraindo interesses científicos, devido a suas propriedades antifúngicas (CAVALEIRO *et al.*, 2006). Essas pesquisas podem

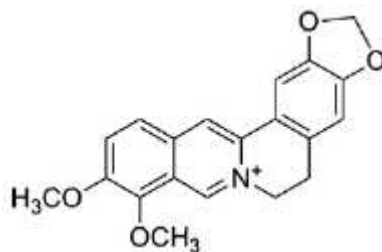
conduzir ao desenvolvimento de drogas efetivas contra fungos patogênicos (MONDELLO *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 80% da população mundial usa medicamentos tradicionais para tratar suas doenças infecciosas ou não infecciosas, sendo a maioria oriundos de plantas e/ou seus produtos. Os compostos como alcalóides, taninos, flavonóides, proteína, peptídeos, glicoproteínas, ácidos fenólicos e os óleos essenciais apresentam atividade normalmente contra *Candida não albicans* (DURAIPANDIYAN, AYYANAR, IGNACIMUTHU, 2006; RAJESHKUMAR e SUNDARARAMAN, 2012).

As fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico, destacando-se que em um curto período de tempo (2005-2007), treze fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização clínica (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Com isso, os produtos naturais de plantas vêm atraindo interesse científico já que inúmeros fármacos tiveram os produtos naturais como ponto de partida.

1.6 Berberina

A berberina (Figura 1) é um alcalóide isoquinolina do tipo protoberberina, isolada a partir de raízes, rizomas e casca de caules de ervas naturais, como: *Berberis aquifolium*, *B. vulgaris*, *B. aristata*, *Hydrastis canadensis*, *Phellodendron amurense*, *Coptis chinensis* e *Tinospora cordifolia* (BEZAKOVA *et al.*, 1996; MISIK *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2008). Muitos estudos tem mostrado que esse composto possui propriedades bioquímicas e farmacológicas, entre elas: antibacterianas, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antidiabéticas, antioxidante e também anticancerígeno (MANTENA; SHARMA; KATIYAR, 2006).



Fonte: LU; WANG; KONG *et al.*, 2011.

Figura 1: Estrutura molecular da berberina

A literatura mostra que a berberina tem sido usada largamente como medicamento natural na China, onde a espécie *Coptis chinensis* é amplamente cultivada na cidade de Chongqing e em outras cidades sob boas práticas agrícolas (GAP) para *Chinese Crude Drugs* (figura 2), e também tem sido usada na Índia para o tratamento de diarreia bacteriana e infecções parasitárias intestinais. Em alguns estudos foi demonstrado que o extrato de berberina possui atividade antimicrobiana significativa contra bactérias, vírus, protozoários, fungos e leveduras (KULKARNI, *et al.*, 2009; CORDERO, *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2009).



Fonte: TANG *et al.*, 2009.

Figura 2: Plantação de *Coptis chinensis* na cidade de Chongqing, China.

Em estudo realizado por Dhamgaye *et al.* (2014) foi demonstrado que a berberina apresenta potencial atividade anti-*Candida*, corroborando com estudos anteriormente realizados e mostrando uma necessidade de mais estudos relacionados a esse composto. Visto que, apesar dos diversos avanços terapêuticos, o tratamento da candidíase ainda é limitado, devido ao baixo número de agentes antifúngicos. Desse modo, esta pesquisa visa colaborar na ampliação dos conhecimentos a respeito de fármacos oriundos de fontes naturais sobre a inibição do crescimento de *Candida* spp.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

2.1 O composto natural berberina apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol?

2.2 Qual provável mecanismo de morte celular da berberina frente às cepas em estudo?

3 HIPÓTESES

3.1 A berberina apresenta atividade *in vitro* frente à *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.2 A berberina promove morte celular por apoptose em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antifúngico da berberina frente a cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol frente a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;

4.2.2 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da berberina frente a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;

4.2.3 Investigar o possível mecanismo de morte celular da berberina através de citometria de fluxo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Microorganismo

Neste estudo foram utilizadas sete cepas do gênero *Candida*: duas *C. tropicalis*, duas *C. parapsilosis* e três *C. albicans*, as quais foram isoladas de amostras biológicas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-CE) e pelo Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ). Estas fazem parte da Coleção de Leveduras do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (LABEL/FF/UFC). As cepas foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose (Himedia Mumbai-Índia) e incubadas a 35°C/24 h. Em seguida foram semeadas em CHROMagar® *Candida* (Himedia Mumbai-Índia) para avaliar a pureza.

5.2 Teste de sensibilidade *in vitro*

O teste de susceptibilidade de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). FLC (Sigma, USA) e berberina foram dissolvidos em água destilada. Ambos foram testados no intervalo de concentração de 0,125-64 µg/mL. No poço 2, foram colocados 200µL da droga e em seguida realizou-se a diluição seriada para obter o intervalo desejado das drogas. As placas foram estocadas a – 20°C, até sua utilização. A partir de um cultivo de 24h da levedura a ser testada, realizado em ágar Sabouraud dextrose, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. Um volume de 100 µL desta suspensão padronizada foi adicionado em cada poço contendo a droga antifúngica. As microplacas foram incubadas por um período de 24 horas a uma temperatura de 35°C (± 2°C). As leituras foram realizadas visualmente após 24h de incubação.

A concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração da droga 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. Os pontos de corte para a susceptibilidade de fluconazol (FLC) são as cepas com CIM ≤ 2µg/mL (sensível), cepas com CIM = 4 µg/mL (sensível dose-dependente) e cepas com CIM ≥ 8 µg/mL (resistente) (CLSI, 2012; DA SILVA *et al.*, 2013; PFALLER *et al.*, 2011).

5.3 Preparo da suspensão

As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial. As células foram colhidas, centrifugadas (1600g por 10 min a 4°C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0,85% (1200g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas ($\sim 10^6$ células /mL) com tampão HEPES [*N*-(2-Hidroxietil) piperazina-*N'*-2-ácido etanosulfônico] (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) suplementado com glicose 2%, pH 7.2. Foi utilizado a Anfotericina B como controle de morte (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.4 Tratamento das células

Para a determinação da densidade de células, a integridade da membrana, medição do potencial transmembrana mitocondrial e externalização da fosfatidilserina, uma cepa representativa de *C. albicans* resistente ao fluconazol foi exposta a concentrações variadas (CIM, 2x CIM e 4x CIM) de berberina a 37°C durante 24 h. Anfotericina B (4 µg/mL) foi utilizada como controle positivo (PINA-VAZ; RODRIGUES, 2010; RUDENSKY *et al.* 2007; DA SILVA *et al.*, 2013)

5.5 Determinação da viabilidade celular e integridade de membrana

A integridade de membrana de células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foi avaliada pelo método de exclusão com iodeto de propídio (2 µg/mL). Aliquotas removidas após 24 horas de incubação com a berberina foram analisadas, de modo que a fluorescência celular foi determinada usando o citômetro de fluxo GuavaEasyCyte™ Mini System Cytometer (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) e o software CytoSoft 4.1 (PINKERTON *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2013).

5.6 Avaliação do potencial de transmembrana ($\Delta\psi_m$)

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado de acordo com a retenção do marcador rodamina 123 (Roda 123) pelas células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol após 24 horas de exposição à berberina. As células foram lavadas com PBS, incubadas com Roda 123 (1 µg/mL) por 35°C por 15 minutos no escuro, e então foram lavadas com PBS. Depois as células foram incubadas novamente em PBS a 35°C no escuro por 30 min, a fluorescência foi determinada usando citômetro de fluxo (GuavaEasyCyte Mini System) (LUDOVICO; MADEO; SILVA, 2008; DA SILVA *et al.*, 2013).

5.7 Marcação por Anexina V

As células tratadas de *C. albicans* foram coletadas por centrifugação e digeridas com 2 mg/mL Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão de fosfato de potássio (PPB, 1 M pH, sorbitol 6,0) durante 2 horas a 30°C. Os protoplastos de *Candida albicans* foram marcados com Anexina V e IP (iodeto de propídeo) utilizando um kit de detecção de apoptose (GuavaNexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). Subsequentemente, as células foram lavadas com PPB e incubadas em tampão de ligação contendo FITC-anexina V (5 µL/mL) e 5 µL de iodeto de propídeo (IP) por 20 minutos no escuro. As células foram analisadas no citômetro de fluxo (GuavaEasyCyte™ Mini System). Para cada experimento (n = 2), 10000 eventos foram avaliados, e os debris celulares foram omitidos da análise (HWANG *et al.*, 2012).

5.8 Análise estatística

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram feitos em triplicata em diferentes dias. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM. Os dados obtidos pelos experimentos de citometria de fluxo foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste do Newman-Keuls (p <0,05).

6 RESULTADOS

6.1 Efeito antifúngico da berberina frente a cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol

A suscetibilidade de cada cepa ao fluconazol foi avaliada usando o método de microdiluição em caldo. Após 24 horas de exposição ao fluconazol, todas as estirpes testadas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentaram CIMs ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$. A inibição do crescimento induzida pela berberina foi também determinada quando testada frente às cepas de *Candida* spp. apresentando CIM igual 8 $\mu\text{g/mL}$ demonstrando assim, uma atividade antifúngica significativa, como observado na tabela 1.

Tabela 1. Teste de susceptibilidade antifúngica do composto de berberina frente às cepas de *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol

Cepas ^a	CIM ^d ($\mu\text{g/mL}$)	
	FLC ^b	BBR ^c
<i>Candida tropicalis</i> 1	≥ 16	8
<i>Candida tropicalis</i> 2	≥ 16	8
<i>Candida albicans</i> 1 *	≥ 16	8
<i>Candida albicans</i> 2	≥ 16	8
<i>Candida albicans</i> 3	≥ 16	8
<i>Candida parapsilosis</i> 1	≥ 16	8
<i>Candida parapsilosis</i> 2	≥ 16	8

^a Cepas de leveduras isoladas de amostras biológicas pertencentes ao LABEL.

^b FLC - fluconazol.

^c BBR – berberina.

^d CIM definido como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células fúngicas, após 24h de incubação.

*Isolado selecionado para testes de citometria de fluxo.

6.2 Perda de viabilidade celular e danos na membrana plasmática em estirpe de *C. albicans*

A análise por citometria de fluxo realizado pelo ensaio de exclusão do iodeto de propídio mostrou que não houve redução significativa no número de células quando as mesmas foram tratadas com o FLC, demonstrando que as mesmas são resistentes. Entretanto, foi demonstrada uma significativa redução no número de células viáveis após o tratamento com a berberina, conforme a Figura 3. Além disso, podemos afirmar que dentre as três concentrações testadas à concentração equivalente a “4x CIM” foi a que mais apresentou redução no número de células viáveis, quando comparada ao controle ($p < 0,05$). A Figura 4 revela que a estirpe resistente ao fluconazol não exibiu perda da integridade da membrana plasmática após exposição de 24 horas ao FLC quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, a mesma figura mostra que na presença do marcador iodeto de propídio (IP) parte das células tornaram-se IP-positivas quando tratadas com a berberina após 24 h de exposição quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$) revelando que berberina pode causar danos à membrana celular em células de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

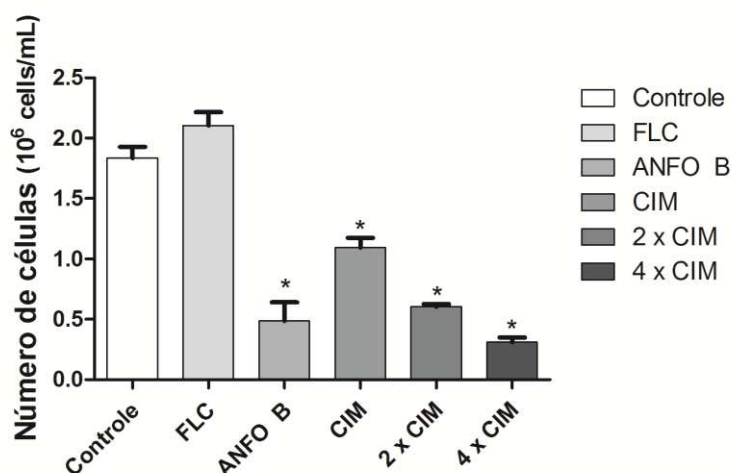


Figura 3: Redução do número de células viáveis tratadas com o composto berberina (CIM, 2xCIM, 4xCIM) em cepa de *Candida albicans* resistente ao FLC após 24 horas de exposição.

* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

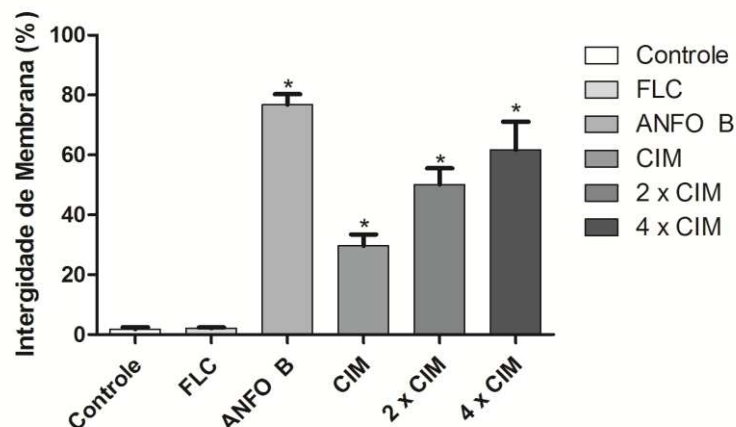


Figura 4: Avaliação da integridade de membrana determinada pelo ensaio de exclusão por iodeto de propídeo (IP), em cepas de *Candida albicans* resistente ao FLC tratadas com a berberina (CIM, 2xCIM, 4xCIM), por um período de 24 horas. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3 Avaliação do Potencial Transmembrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$).

Após 24 h de exposição à berberina nas diferentes concentrações (MIC, 2xMIC e 4xMIC), alterações significativas no $\Delta\psi_m$ foram observados em *C. albicans* resistentes ao fluconazol (figura 5) quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que estas moléculas podem afetar a função respiratória mitocondrial, causando um colapso no $\Delta\psi_m$, fazendo com que a Roda 123 não se acumule nas mitocôndrias.

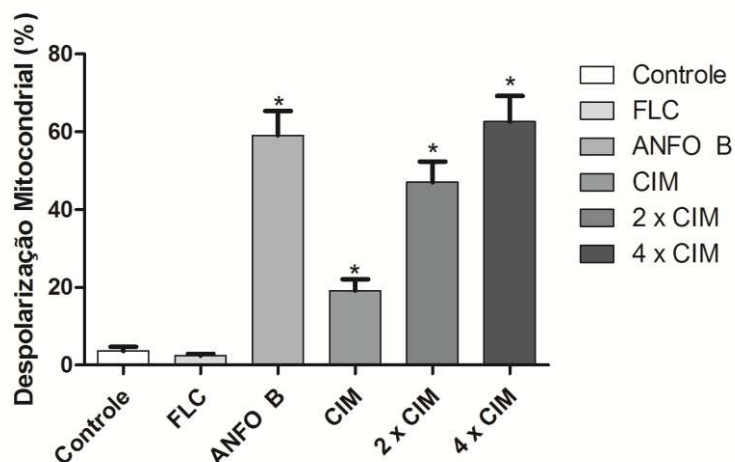


Figura 5: Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de *Candida albicans* resistente ao FLC tratadas com berberina (CIM, 2xCIM, 4xCIM) por um período de 24 horas. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4 Externalização da Fosfatidilserina em células de *C. albicans*.

Células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol tratadas com berberina nas concentrações MIC, 2xMIC e 4xMIC apresentaram um aumento significativo no número de células em apoptose quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 6).

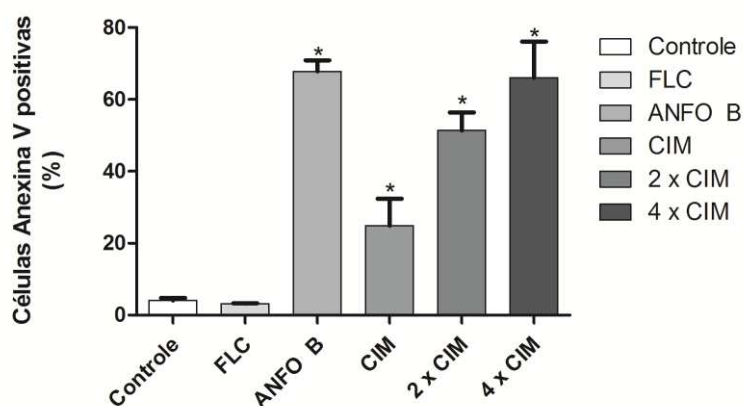


Figura 6: Externalização da fosfatidilserina pela marcação com anexina V em células de *C.albicans* resistente ao fluconazol tratadas com berberina em diferentes concentrações (CIM, 2xCIM, 4xCIM) após 24 horas de exposição. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

7 DISCUSSÃO

Nesse estudo, de acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que a berberina apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Fato este que corrobora com o estudo realizado por Dhamgaye *et al.*(2014) que na busca por novos agentes anti-*Candida*, estudou o mecanismo de ação da berberina frente *Candida albicans* e *Candida* não *albicans*, e então ofereceu evidências de que o tratamento de células de *Candida* spp. com berberina afeta a via da calcineurina e a integridade da parede celular, promovendo a disfunção mitocondrial e, conseqüentemente levando a morte celular. Além disso, um estudo realizado por Vollekova *et al.*(2003) demonstraram a atividade antifúngica desse composto frente a cepas de *C. tropicalis* (inibição do crescimento com 62,5µg /ml de berberina).

Após a exposição das cepas de *Candida albicans* a berberina, foi observada uma diminuição no número de células viáveis nas concentrações tratadas (MIC, 2xMIC e 4xMIC) quando comparado ao controle, na presença do marcador citofluorométrico Iodeto de Propídio (IP), indicando assim danos as membranas celulares com possível comprometimento em suas funções. Dados estes que estão de acordo com os de Dhamgaye *et al.* (2014) que demonstraram que a berberina pode promover a perda da integridade da membrana, causando aumento da permeabilidade celular. A absorção aumentada de IP nas células de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol torna-se um indicativo de que estes compostos promovem a morte celular, visto que este marcador só consegue se ligar ao DNA nuclear de células mortas (XU *et al.*, 2010).

Desse modo, vale destacar que a membrana celular é um alvo potencial para a ação de antimicrobianos, pois drogas que atuam nesse sítio específico demonstram um maior potencial terapêutico por apresentarem um efeito antimicrobiano rápido e de amplo espectro, além de serem menos propensas a desenvolverem mecanismos de resistência (MEHRAVAR e SARDARI, 2011). Entretanto, apesar de parecer correto afirmar que as células de microrganismos com comprometimento das membranas sejam consideradas mortas, ou até mesmo que células com a membrana intacta sejam células ativas, essas alegações não são necessariamente subsistentes (BERNEY *et al.*, 2007; NEBE-VON-CARONET *et al.*, 2000). Portanto se faz necessária uma avaliação do comprometimento de outros sítios celulares nas células microbianas, após a exposição de drogas (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2015).

A morte por apoptose é um programa de suicídio peculiar que se caracteriza pela externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, pelos danos mitocondriais e liberação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma (SUKHANOVA *et al.*, 2012). A fase inicial do caminho para a apoptose é considerada pela perda do potencial transmembrana mitocondrial (HWANG *et al.*, 2014). No presente estudo, os resultados apresentados também indicam que as células quando tratadas com berberina promovem alterações no potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), sugerindo que esta molécula pode afetar a função respiratória mitocondrial, causando um colapso no $\Delta\psi_m$, fazendo com que a rodamina 123 não se acumule nas mitocôndrias (LUDOVICO; SANSONETTY; CÔRTE-REAL, 2001). Esse colapso do $\Delta\psi_m$ pode conduzir a aberturas de poros transientes nas membranas mitocondriais e a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol (HWANG *et al.*, 2012). De acordo com os nossos achados, Dhamgaye *et al.* (2014) também observaram que células de *C. albicans* tratadas com berberina apresentam disfunção mitocondrial.

Um estudo realizado por Xu *et al.* (2009) mostrou que o tratamento com fluconazol + berberina em *Candida albicans* resistentes ao fluconazol proporcionou um aumento do $\Delta\psi_m$, sugerindo que este aumento está acoplado com um baixo nível de ATP quando a atividade da ATP-sintase é inibida. Esse estudo mostrou também que tratamento com somente com berberina não provocou uma alteração significativa no $\Delta\psi_m$, indo de encontro aos resultados relatados no presente estudo.

A detecção de apoptose, numa fase inicial pode ser determinada utilizando Anexina V. Esse marcador na presença do íon Ca^{2+} , liga-se com elevada afinidade a fosfatidilserina presente nas membranas das células apoptóticas (HWANG *et al.*, 2012). Entretanto, a coloração Anexina V conjugado com FTIC + IP, permite a discriminação entre apoptose precoce e necrose (EISENBERG *et al.*, 2010). De acordo com nossos dados, a berberina causa morte por apoptose em células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Um estudo realizado por Park *et al.* (2015) mostrou que a berberina induz apoptose em células cancerígenas pancreáticas, corroborando assim com os resultados por nós encontrados.

O presente trabalho aponta para uma eficaz atividade biológica da berberina, sugerindo no futuro esse composto possa ser usado como agente antifúngico para tratamento de candidemias. Contudo, mais ensaios farmacológicos e de toxicidade serão necessários para confirmar esta hipótese.

8 CONCLUSÃO

O composto berberina apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra as cepas em estudo, bem como promove alterações na integridade das membranas plasmática e mitocondrial, levando as células à morte por apoptose. Diante do exposto, faz-se necessária a realização de mais estudos relacionados à ação desse composto frente a *Candida spp.* resistente ao fluconazol, visto que eles ainda são escassos nesse âmbito, para que assim a berberina possa fornecer um novo protótipo a fármacos, aliando-se no futuro ao arsenal terapêutico disponível.

RERERÊNCIAS

ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, p. 201–205, 2011.

ANDRADE, N.J.B. *et al.* Effects of Piperonal Nitro Derivatives on *Candida* species: Antifungal Activity against Fluconazole-Resistant Strains Associated with Oxidative DNA Damage. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.4, p. 777-792, 2015.

ARENDRUP, M.C. *et al.* National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 325–34, 2011.

ARNOLD, H.M. *et al.* Hospital resource utilization and costs of inappropriate treatment of candidemia. **Pharmacotherapy**, v 30, p. 361–368, 2010.

BARBEDO, L.S. e SGARBI, D.B.G. Candidiasis. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, p.22–38, 2010.

BASSETTI, M. *et al.* Incidence, risk factors and predictors of outcome of candidemia: survey in 2 Italian university hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 325–331, 2007.

BERNEY, M. *et al.* Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 73, p. 3283–3290, 2007.

BEZAKOVA, L. *et al.* Lipxygenase inhibition and antioxidant properties of bisbenzylisoquinoline alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. **Pharmazie**, v. 51, p. 758-761, 1996.

CARRILLO-MUÑOZ A. J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells, **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 19, p. 130–139, 2006.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections.

International Journal of Antimicrobial Agent, v.44, p. 320–326, 2014.

CAVALEIRO, C. *et al.* Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1333-1338, 2006.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: A role for polyenes.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 457-465, 2011.

CHEN, J. *et al.* Analysis of major alkaloids in *Rhizoma coptidis* by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes.

Electrophoresis, v. 29, p. 2135-2147, 2008.

CHONG, Y. *et al.* Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 18, p.741–746, 2012.

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, p. 2816–2823, 2006.

COLOMBO, R.E. e VAZQUE, J. Echinocandins for Primary Therapy of Candidemia: Time for a Paradigm Shift? **Current Fungal Infection Reports**, v 9, p.15 –22, 2015.

CORDERO, C.P. *et al.* Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants. **Fitoterapia**, v. 75, p. 225-227.2004.

COSTA, A. C. B. P. *et al.*, Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. **Mycoses**, v. 56, p. 614–622, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2 , p. 47-58, 2010.

D'EÇA JÚNIOR, A.D.E. *et al.* In vitro differential activity of phospholipase And acid proteinase of clinical isolates of *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 334–338, 2011.

DA COSTA, V. G. *et al.* Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, v. 178, p.243–250, 2014.

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

DANNAOUI, E. Résistance des Candida aux antifongiques : détection et mécanismes. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 450, p. 2-7, 2013.

DE FREITAS, A. R. *et al.* Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, p. 104–108, 2014.

DHAMGAYE, S. *et al.* Molecular Mechanisms of Action of Herbal Antifungal Alkaloid Berberine, in *Candida albicans*. **PLoS ONE**, v.9, p. e104554, 2014.

DIEKEMA, D.J. *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1298–1302, 2002.

DURAIPANDIYAN, V.; AYYANAR, M., IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6; p. 35, 2006.

EISENBERG, T. *et al.* Necrosis in yeast. **Springer Science**, v. 15, p. 257-268, 2010.

FERREIRA, D. *et al.* Outcomes associated with routine systemic antifungal therapy in critically ill patients with *Candida* colonization, **Intensive Care Medicine**, v. 41, p. 1077-1088, 2014.

GUO, F. *et al.* Invasive candidiasis in intensive care units in China: a multicenter prospective observational study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p.1660 – 1068, 2013.

HWANG, I. S. *et al.* Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 173, p. 207–218, 2012.

HWANG, J.H. *et al.* Hibicuslide C-induced cell death in *Candida albicans* involves apoptosis mechanism. **Journal of Applied Microbiology**, v.117, p. 1400-1411, 2014.

KARACAER, Z. *et al.* A surveillance of nosocomial *candida* infections: epidemiology and influences on mortality in intensive care units. **Pan African Medical Journal**, v. 19, p.398, 2014.

KOTHAVADE, R. J. *et al.* *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873–880, 2010.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. **Phytotherapy Research**, v.24, p.317-324. 2009.

LIONAKIS, M.S.; NETEA, M.G. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, p. e1003079, 2013.

LU, J.; WANG, J.S.; KONG, L.Y. Anti-inflammatory effects of Huang-Lian-Jie-Du decoction, its two fractions and four typical compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 911–918, 2011.

LUDOVICO, P.; MADEO, F.; SILVA, M. Yeast programmed cell death: an intricate puzzle. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 57, p. 129–135, 2008.

LUDOVICO, P; SANSONETTY, F; CÔRTE-REAL, M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v.147, p. 3335-3343, 2001.

MANTENA, S.K.; SHARMA, S.D.;KATIIYAR,S.K. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3- dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 296-308, 2006.

MATHEW, B.P. e NATH, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**, v. 4, p. 310–323, 2009.

MATTHAIIOU, D. K.; CHRISTODOULOPOULOU, T.; DIMO, G. How to treat fungal infections in ICU patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p.250, 2015.

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

MCNEIL, M.M. *et al.* Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 641–647, 2001.

MEHRAVAR, M. e SARDARI, S. Screening of antimicrobial membrane-active metabolites of soil microfungi by using chromatic phospholipid/polydiacetylene vesicles. **Journal Mycologie Médicale**, v. 21, p. 188-197, 2011.

MIN, Z.; CURTIS, J. R.; BADDLEY, J. W. Epidemiologic Research of Invasive Fungal InfectionsUsing Large Healthcare Databases. **Current Fungal Infection Reports**, v.7, p.320-325, 2013.

MISIK, V. *et al.* Lipxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from Mahonia aquifolium. **Planta Medica**, v.61, p.372-373, 1995.

MONDELLO, F. *et al.* In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheele (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida species*. **BMC Infection Diseases**, v. 6, p. 158, 2006.

MONTAGNA, M.T., *et al.* Candidemia in intensive care unit: a Nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of European literature from 2000 through 2013. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 661-674, 2014.

MORACE, G. e BORGHI, E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. **Minerva Anestesiologica**, v. 76, p. 950–956, 2010.

NEBE-VON-CARON, G. *et al.* Analysis of bacterial function by multicolour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal Microbiological Methods**, v.42, p.97-114, 2000.

NEUFELD, P. M. *et al.* Prevalência e Susceptibilidade in vitro a Itraconazol e Anfotericina B de Isolados Clínicos de *Candida*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, p. 119–125, 2009.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PloS one**, v. 8, p. e59373, 2013.

ORTEGA, M. *et al.* *Candida* spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 562–568, 2010.

PAPPAS, P.G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.20, p. 485-506, 2006.

PARK, S.H. *et al.* Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 111-119, 2015.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006–2011. **Mycoses**.v.57, p. 602–611, 2014.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3–13, 2012a.

PFALLER, M. *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, p. 323–331, 2012b.

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

PFALLER, M.A. *et al.* Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, p. 164-176, 2011.

PINA-VAZ, C. *et al.* Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 678-685, 2005.

PINKERTON, D.M. *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E–J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 1311-1324, 2010.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis: A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**., v. 31, p. 42–48, 2014.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status quo. **Mycoses**, v.55, p. 60-73, 2012.

Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd edition. (Approved standard. M27-A3). **Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI)**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

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

RUDENSKY, B. *et al.* Direct fluconazole susceptibility testing of positive *Candida* blood cultures by flow cytometry. **Mycoses**, v. 56, p. 678–685, 2007.

SANTOS, J.R. *et al.* Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**; v.15, p.189-197, 2005.

SARABAH, S. *et al.* Changing pattern of fungal infection in burn patients. **Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 38, p. 520–528, 2012.

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

SUKHANOVA, E. I. *et al.* Phenoptosis in yeasts. **Biochemistry (Moscow)**, v.77, p. 761-775, 2012.

TAMURA, N. K. *et al.* Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 91-93, 2007.

TANGA, J. *et al.* Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 5–17, 2009.

TOBUDIC, S. *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, p. 199 – 204, 2012.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

VOLLEKOVÁ, A. *et al.* Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* extract and its major protoberberine alkaloids. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 834–837, 2003.

XU, C. *et al.* The anthracenedione compound bostrycin induces mitochondria mediated apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v.10, p. 297-308. 2010.

XU, Y. *et al.* Proteomic Analysis Reveals a Synergistic Mechanism of Fluconazole and Berberine against Fluconazole-Resistant *Candida albicans*: Endogenous ROS Augmentation. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.5296–5304, 2009.

YING, S. e CHUNYANG, L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. **Mycoses**, v. 55, p. 50–55, 2012.

