

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Liliana Scorzoni

“Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero *Candida* após tratamento com extratos de *Kielmeyera rubriflora*”

Araraquara
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Liliana Scorzoni

“Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero *Candida* após tratamento com extratos de *Kielmeyera rubriflora*”

Tese apresentada ao programa de Pós- Graduação em
Análises Clínicas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas –
UNESP – Araraquara, como pré – requisito para
obtenção do título de Mestre Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara
2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Scorzoni, Liliana

S423e Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero *Candida* após tratamento com extratos de *Kielmeyera rubriflora*. / Liliana Scorzoni. – Araraquara, 2008.
102 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1.*Candida* spp. 2.Atividade antifúngica de plantas. 3.Micologia.
I.Giannini, Maria José Soares Mendes, orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e do PADC-FCFAR.

PIPOCA.....

“...comidas, para mim, são entidades oníricas. Provocam a minha capacidade de sonhar. Nunca imaginei, entretanto, que chegaria um dia em que a pipoca iria me fazer sonhar. Pois foi precisamente isso que aconteceu.

A pipoca é um milho mirrado, sub-desenvolvido. Fosse eu agricultor ignorante, e se no meio dos meus milhos graúdos aparecessem aquelas espigas nanicas, eu ficaria bravo e trataria de me livrar delas. Pois o fato é que, sob o ponto de vista de tamanho, os milhos da pipoca não podem competir com os milhos normais. Não sei como isso aconteceu, mas o fato é que houve alguém que teve a idéia de debulhar as espigas e colocá-las numa panela sobre o fogo, esperando que assim os grãos amolecassem e pudessem ser comidos. Havendo fracassado a experiência com água, tentou a gordura. O que aconteceu, ninguém jamais poderia ter imaginado. Repentinamente os grãos começaram a estourar, saltavam da panela com uma enorme barulheira. Mas o extraordinário era o que acontecia com eles: os grãos duros quebra-dentes se transformavam em flores brancas e macias que até as crianças podiam comer. O estouro das pipocas se transformou, então, de uma simples operação culinária, em uma festa, brincadeira, molecagem, para os risos de todos, especialmente as crianças. É muito divertido ver o estouro das pipocas!

Mas a transformação só acontece pelo poder do fogo. Milho de pipoca que não passa pelo fogo continua a ser milho de pipoca, para sempre. Assim acontece com a gente. As grandes transformações acontecem quando passamos pelo fogo. Quem não passa pelo fogo fica do mesmo jeito, a vida inteira. São pessoas de uma mesmice e dureza assombrosa. Só que elas não percebem. Acham que o seu jeito de ser é o melhor jeito de ser. Mas, de repente, vem o fogo. O fogo é quando a vida nos lança numa situação que nunca imaginamos. Dor. Pode ser fogo de fora: perder um amor, perder um filho, ficar doente, perder um emprego, ficar pobre. Pode ser fogo de dentro. Pânico, medo, ansiedade, depressão - sofrimentos cujas causas ignoramos. Há sempre o recurso aos remédios. Apagar o fogo. Sem fogo o sofrimento diminui. E com isso a possibilidade da grande transformação.

Em Minas, todo mundo sabe o que é piruá. Falando sobre os piruás com os paulistas descobri que eles ignoram o que seja. Alguns, inclusive, acharam que era gozação minha, que piruá é palavra inexistente. Cheguei a ser forçado a me valer do Aurélio para confirmar. Com certeza tem uma explicação científica para os piruás. Mas, no mundo da poesia as explicações científicas não valem. Por exemplo: em Minas ‘piruá’ é o nome que se dá às mulheres que não conseguiram casar. Mas acho que o poder metafórico dos piruás é muito maior. Piruás são aquelas pessoas que, por mais que o fogo es quente, se recusam a mudar. Elas acham que não pode existir coisa mais maravilhosa do que o jeito delas serem. Ignoram o dito de Jesus: ‘Quem preservar a sua vida perde-la-á.’ A sua presunção e o seu medo são a dura casca do milho que não estoura. O destino delas é triste. Vão ficar duras a vida inteira. Não vão se transformar na flor branca macia. Não vão dar alegria para ninguém. Terminado o estouro alegre da pipoca, no fundo da panela ficam os piruás que não servem para nada. Seu destino é o lixo. Quanto às pipocas que estouraram, são adultos que voltaram a ser crianças e que sabem que a vida é uma grande brincadeira”. (Rubem Alves, O amor que acende a lua).

“O dia mais belo: hoje

A coisa mais fácil: errar

O maior obstáculo: o medo

O maior erro: o abandono

A raiz de todos os males: o egoísmo

A distração mais bela: o trabalho

A pior derrota: o desânimo

Os melhores professores: as crianças

A primeira necessidade: comunicar-se

O que traz felicidade: ser útil aos demais

O pior defeito: o mau humor

A pessoa mais perigosa: a mentirosa

O pior sentimento: o rancor

O presente mais belo: o perdão

o mais imprescindível: o lar

A rota mais rápida: o caminho certo

A sensação mais agradável: a paz interior

A maior proteção efetiva: o sorriso

O maior remédio: o otimismo

A maior satisfação: o dever cumprido

A força mais potente do mundo: a fé

As pessoas mais necessárias: os pais

A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!” Madre Tereza de Calcutá

Dedicatória:

A Deus pela vida, saúde, minha família, meus amigos e por me guiar nessa incrível tarefa chamada pós graduação.

Em especial a minha querida família.

Aos meus pais por todo apoio, compreensão e por serem meus exemplos de luta, persistência, honestidade e amor por estarem presentes em todos o momentos e por não medirem esforços para a realização de meus sonhos.

Aos meus irmãos, meus irmãozinhos mais novos, pela empatia, carinho e cumplicidade.

Ao meu namorado, grande companheiro e amigo, por estar sempre ao meu lado me apoiando, por escutar a cada história mirabolante e por me conhecer tão bem.

Aos meu avós maternos e paternos por se interessarem pelo meu trabalho sempre curiosos, perguntando, ouvindo com toda a atenção do mundo e ficando entusiasmados, mesmo sem o conhecimento científico.

A vocês com muito carinho!

Amo vocês!

Agradecimentos:

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, pelo exemplo de luta, liderança e perseverança. Por instigar a atingir o desafio lançado. Obrigado pela orientação e oportunidade e pelo crescimento pessoal e profissional.

Aos meus Anjos da Guarda, Elaine e Rosângela, pelos precisos ensinamentos, (que vão desde técnicas de isolamento e identificação dos fungos até a culinária), pelo carinho, conselhos e principalmente pela paciência.

Aos meus companheiros “micológicos” pós-graduandos Aline, Ana Marisa, Fernanda, Haroldo, Julhiany, José Nelson, Marcelo (valeu Japão !!!), Marciano, Tatiane, Regina e Roberta e também companheiros “micológicos” de iniciação científica e estagiários Ana Carolina (Pi), Ana Carolina e Bruna (Uniara), Carol, Adriana, Marina, Juliana, Fábio, Natália, Alex Rodrigo, pelo ótima convivência, pelo bom humor contagiante, pelas risadas que tornaram meu trabalho mas leve e gostoso, por me escutarem e ajudarem nas dificuldades e desafios encontrados nessa etapa. Carrego comigo um pouquinho de cada um de vocês.

Aos que passagem por esse laboratório, (Lilian, Fabiana, Patricia, Rosana, Susana) muitas saudades.

Á todos os agregados da Micologia, Bel Cito, Marisa Imuno, Gustavo, pela colaboração e pelo bom convívio. E também a Rosemira por seu bom humor e sorriso contagiante.

As minhas vizinhas da kit por tornarem essa etapa mais agradável e divertida e também a minha mais que vizinha, minha amigona, Gláucia, por estar ao meu lado sempre, por escutar, não apenas ouvir.

Aos meus eternos amigos Diego Barione, Diego Arruda, Mariana Carla, Mariana Coelho, Pedro (Mão), Rodrigo, Ricardo (Jurca) e suas digníssimas e digníssimos namorados, por cada palavra e olhar de carinho, apoio e compreensão, pra sempre.....

SUMÁRIO

	PAG
Resumo	1
Abstract	3
1. Introdução	5
2. Justificativa	16
3. Objetivos	17
4. Metodologia	18
4.1. Microrganismo e condições de cultivo	18
4.2. Preparo das substâncias vegetais	18
4.3. Avaliação da atividade antifúngica	18
4.4. Concentração fungicida mínima	19
4.5. Seleção dos extratos	19
4.6. Tratamento das células fúngicas e extração das proteínas	19
4.7. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	20
4.8. Análise protéica por Eletroforese Bidimensional:	20
5. Resultados	21
5.1. Avaliação da atividade antifúngica	21
5.2. Seleção do extrato para contato com as leveduras de gênero <i>Candida</i> e análise proteômica	27
5.3. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	28
5.4. Análise protéica por eletroforese bidimensional:	29
5.4.1. <i>Candida albicans</i> com e sem tratamento	29
5.4.2. <i>Candida krusei</i> com e sem tratamento	36
6. Discussão	46
7. Conclusões	53
8. Referencias Bibliográficas	54

LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1: Estrutura molecular dos antifúngicos anfotericina B e flucitosina	20
Figura 2: Estrutura molecular do colesterol e ergosterol.	22
Figura 3: Estrutura molecular do antifúngico fluconazol	23
Figura 4: Estrutura molecular do antifúngico caspofungina pertencente à classe das equinocandinas.	23
Figura 5: SDS-PAGE dos componentes protéicos de <i>C. albicans</i> sem tratamento (C-) e tratada com 1000µg/mL dos extratos brutos AcOEt e EtOH de <i>K. rubriflora</i> e 1400 µg/mL de fluconazol	28
Figura 6: SDS-PAGE dos componentes protéicos de <i>C. krusei</i> sem tratamento (C-) e tratada com 1000µg/mL dos extratos brutos AcOEt e EtOH de <i>K. rubriflora</i> e 1400 µg/mL de fluconazol	29
Figura 7: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de <i>C. albicans</i> na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com fluconazol na concentração de 1400 µg/mL em géis corados pelo azul de Coomassie.	30
Figura 8: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de <i>C. albicans</i> com tratamento com fluconazol na concentração de 1400 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.	31
Figura 9: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de <i>C. albicans</i> na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com o extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de <i>K. rubriflora</i> , na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie.	32
Figura 10: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de <i>C. albicans</i> com tratamento com o extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de <i>K. rubriflora</i> na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.	33
Figura 11: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de <i>C. albicans</i> na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com extrato bruto etanólico	34

(EtOH) de *K. rubriflora* na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie.

Figura 12: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* com tratamento com o extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora* na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas. **35**

Figura 13: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* com tratamento com o fluconazol na concentração de 1400 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie. **36**

Figura 14: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* com tratamento com o fluconazol na concentração de 1400 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas. **37**

Figura 15: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie **38**

Figura 16: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* com tratamento com extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas. **39**

Figura 17: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com Extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie. **42**

Figura 18: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* com tratamento com Extrato bruto etanólico (EtOH) na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas **43**

LISTA DE TABELAS

	PAG
Tabela 1: Valores de CIM e CMF de <i>Alibertia sessilis</i> , pertencente à família Rubiaceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	21
Tabela 2: Valores de CIM e CMF de <i>Alibertia macrophylla</i> , pertencente à família Rubiaceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> .	22
Tabela 3: Valores de CIM e CMF de <i>Alibertia edulis</i> , pertencente à família Rubiaceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	22
Tabela 4: Valores de CIM e CMF de <i>Machaerium villosum</i> , pertencente à família Leguminosae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> .	23
Tabela 5: Valores de CIM e CMF de <i>Cryptocarya mandioccana</i> e <i>moschata</i> , pertencente à família Lauraceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> .	24
Tabela 6: Valores de CIM e CMF de <i>Peperomia obtusifolia</i> , pertencente à família Piperaceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	25
Tabela 7: Valores de CIM e CMF de <i>Peperomia sp</i> , pertencente à família Piperaceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> .	26
Tabela 8: Valores de CIM e CMF de <i>Kielmeyera rubriflora</i> , pertencente à família Clusiaceae, testados contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	27
Tabela 9: Proteínas demonstradas na figura 7, seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com fluconazol.	31
Tabela 10: Proteínas demonstradas na figura 9, seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com AcOEt de <i>K. rubriflora</i> .	33
Tabela 11: Proteínas demonstrados na figura 11, seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com EtOH de <i>K. rubriflora</i> .	35
Tabela 12: Proteínas demonstradas na figura 13, seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com fluconazol.	37

Tabela 13: Proteínas demonstradas na figura 15, seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*. **40**

Tabela 14: Proteínas não expressas com o tratamento com o extrato bruto acetato de etila de *K. rubriflora*. **41**

Tabela 15: Proteínas demonstradas na figura 17, seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora* **44**

Tabela 16: Proteínas não expressas com o tratamento com o extrato bruto etanólico. **45**

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Celcius
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EtOH	Etanol
G	Gravidade
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
UFC	Unidades formadoras de colônia
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

RESUMO

As novas descobertas tecnológicas e o avanço da medicina têm proporcionado a sobrevida de muitos pacientes. No entanto, estes passam a ser mais suscetíveis a infecções, principalmente por fungos. O aumento dessas infecções tem gerado problemas no tocante ao diagnóstico, bem como na terapêutica empregada. A disponibilidade de antifúngicos na prática médica é relativamente pequena, algumas vezes ineficiente e com toxicidade elevada. Recentemente, houve um agravante do quadro devido ao surgimento de resistência a determinadas drogas, o que reforçou a demanda por novas alternativas terapêuticas. Nosso país é privilegiado pela grande biodiversidade. A busca por novos alvos, o entendimento dos mecanismos de virulência, bem como os de resistência microbiana são fundamentais diante do quadro atual. O objetivo deste estudo foi pesquisar extratos e substâncias de plantas com atividade antifúngica para *Candida albicans* e *C. krusei*, selecionar os de maior atividade e verificar o perfil de proteínas de ambas as leveduras, antes e após o contato com a substância de origem vegetal, realizando sua caracterização. Os extratos acetato de etila (AcOEt) e etanólico (EtOH) de *Kielmeyera rubriflora* foram os que apresentaram maior atividade antifúngica. Os componentes protéicos de *C. albicans* sem tratamento e tratados com 1400 µg/mL de fluconazol e 1000 µg/mL dos extratos AcOEt e EtOH foram analisados por SDS-PAGE e eletroforese bidimensional. O tratamento com fluconazol revelou modificações na expressão de nove proteínas, que variaram seus pIs de 5,64 a 6,67 e massa molecular de 59,1 a 17,4 kDa, enquanto que os extratos de plantas influenciaram na expressão de 10 e 11 proteínas, respectivamente. O extrato AcOEt influenciou na expressão de proteínas na faixa de pIs de 5,7 a 5,2, massa molecular de 90,5 a 18,8 kDa, enquanto que o EtOH, em pIs de 5,8 a 7,4, e massa molecular de 89,2 a 16,3 kDa. Os extratos de plantas propiciaram a expressão diminuída de maior número de proteínas do que fluconazol. O tratamento de *C. krusei* com fluconazol gerou 11 modificações na expressão das proteínas, sendo essas de pI entre 4,9 e 6,2 e massa molecular de 89,3 a 17,0 kDa. O tratamento de *C. krusei* com ambos os extratos influenciaram no aumento ou diminuição da expressão de 66 proteínas variando seus

pls entre 4,3 e 7,4 e massas moleculares entre 96,0 e 14,1 kDa. Por outro lado, 44 proteínas com pls variando de 4,7 a 8,8 e massas moleculares entre 89.3 e 14.1 kDa, respectivamente, não foram expressas após o tratamento. Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para inibição da expressão protéica de *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos.

ABSTRACT

The new discoveries and technological advances in medicine have provided the survival of many patients. However, they become more susceptible to infections, mainly by fungi. The increase in these infections has created problems regarding the diagnosis and the therapy employed. The availability of antifungals in medical practice is relatively small, inefficient and sometimes with high toxicity. Recently, there was an aggravating problem due to the emergence of resistance to certain drugs, which increased the demand for new alternative therapies. Our country is privileged in biodiversity. The search for new targets, the understanding of the mechanisms of virulence, as well as, the microbial resistance is essential before the current framework. This study aimed to find extracts of plants and substances with antifungal activity to *Candida albicans* and *C. krusei*, select the extracts with the best activity and verify the profile of proteins of both yeasts, before and after contact with the ethyl acetate (AcOEt) and ethanol (EtOH) extracts from *Kielmeyera rubriflora*, performing its characterization. The AcOEt and EtOH extracts from *K. rubriflora* had the greater antifungal activity. The *C. albicans* and *C. krusei* cells proteins untreated and treated with 1400 µg / mL of fluconazole and 1000 µg / mL of AcOEt and EtOH extracts were analyzed by SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis. Treatment with fluconazole revealed changes in the expression of nine proteins, which varied its pIs of 6.67 to 5.64 and molecular weight of 59.1 to 17.4 kDa, while the plants extracts influenced the expression of 10 and 11 proteins, respectively. The AcOEt extract influenced the expression of proteins in the range from pIs of 5.7 to 5.2, molecular weight of 90.5 to 18.8 kDa, while the EtOH in pIs of 5.8 to 7.4, and mass molecular of 89.2 to 16.3 kDa. The plants extracts reduced greater number of proteins than fluconazole and apparently the profile is different. The treatment of *C. krusei* with fluconazole generated 11 changes in the expression of proteins, and these were of pI of between 4.9 and 6.2 and molecular weight of 89.3 to 17.0 kDa. The treatment of *C. krusei* with both extracts influenced the increase or decreases of the 66 proteins expression with pIs ranging from 4.3 to 7.4 and molecular weights from 96.0 to 14.1 kDa. In addition, 44 proteins were not expressed after treatment

and their pIs ranging from 4.7 to 8.8 and molecular weights from 89.3 to 14.1 kDa, respectively. Apparently, both extracts were more efficient for *C. krusei* protein expression changes than *C. albicans*, suggesting a specific target, opening possibilities for new antifungal drugs.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas teve um aumento significativo nas décadas recentes. Isto se deve ao crescimento da população de pacientes imunocomprometidos como os pacientes com o vírus HIV, com câncer, aqueles sob tratamento com quimioterápicos e drogas citotóxicas. Recentemente, as novas descobertas tecnológicas e os avanços da medicina, proporcionaram a sobrevivência de muitos pacientes, em contrapartida, muitos destes tornaram-se altamente suscetíveis a infecções causadas por organismos que eram considerados de baixa virulência ou até mesmo não patogênicos (SANDVEN et al., 2000; GARBER et al., 2001; PFALLER e DIEKEMA, 2007)

Os principais agentes etiológicos que contribuem para o aumento das infecções são as espécies do gênero *Candida*, acometendo significativamente pacientes nas unidades de terapia intensiva; *Aspergillus*, um dos principais causadores de infecções invasivas; *Fusarium* e várias espécies de zigomicetos, incluindo *Rhizopus* e *Mucor* (ZUPANIC-KRMEK et al., 2004; KAUFFMAN, 2006). As dermatofitoses também sofreram um aumento significativo e *Trichophyton rubrum*, sendo o agente de maior prevalência (BAEZA et al., 2004; TAN, 2005; HAPCIOGLU et al., 2006). *Cryptococcus neoformans* é o patógeno mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central em pacientes HIV positivos. Estima-se que 25-30% desses pacientes morrerão em consequência de meningite cryptocócica (PAPPALARDO e MELHEM, 2003; LARSEN et al., 2004).

Candida albicans presente na cavidade bucal e trato gastrintestinal de indivíduos saudáveis são um dos principais agentes causadores das micoses humanas, sendo a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas (RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; SHAO et al., 2007). O prognóstico dessas infecções é limitado pela eficácia reduzida das drogas atualmente disponíveis, pelo desenvolvimento de resistência e também pela falta de testes diagnósticos rápidos e específicos (SANGIARD, 2002; KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002; SHAO et al., 2007). As razões para a falta de diagnósticos específicos incluem as manifestações clínicas inespecíficas, sensibilidade baixa das técnicas microbiológicas de hemoculturas, além da

indisponibilidade das culturas de amostras de tecidos profundos, devido aos riscos associados aos procedimentos invasivos utilizados na obtenção desses tecidos (BLUMBERG et al, 2001; MÉAN et al, 2008).

As infecções por leveduras têm-se destacado pelo aumento de casos (SWOBODA et al, 2003; PASQUALOTTO et al, 2006; CAREY et al., 2008). Essa incidência elevada tem sido documentada em vários lugares do mundo (PFALLER et al., 2001; PFALLER e DIEKEMA, 2007). Nos Estados Unidos, as espécies de *Candida* estão em quarto lugar entre as causas de infecções nosocomiais sendo responsável por 8 a 15% dos casos de septicemia (WISPLINGHOFF et al, 2004; PFALLER e DIEKEMA, 2007). Relatos de hospitais dos Estados Unidos e da Europa detectaram o aumento na prevalência das infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (VISCOLI et al, 1999; TRICK et al, 2002; PFALLER e DIEKEMA, 2007). Na Alemanha, a espécie mais frequentemente isolada é *C. albicans* (58.5%), seguida por *C. parapsilosis* (8.0%) e *C. tropicalis* (7.5%) (ZEPELIN et al, 2007). No Brasil, a taxa de incidência relatada foi maior que a dos países europeus e dos Estados Unidos, sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada em todos os hospitais, e entre as *Candida* não-*albicans* houve predominância de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COLOMBO 2000; MARCHETTI et al, 2004; COLOMBO et al., 2007). Com isso, a candidíase representa um problema de saúde pública e as pesquisas de novos alvos, bem como de novos agentes antifúngicos são essenciais para a melhora deste quadro.

No mercado existem cinco classes de drogas antifúngicas disponíveis (polienos, fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e alilaminas), todas elas com sérias desvantagens, algumas não possuem amplo espectro de ação, outras não são seletivas para o fungo, sendo tóxicas para o hospedeiro e muitas são fungistáticas e não fungicidas havendo o risco de recidivas, além do aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos de uso clínico, o que é atualmente um problema de difícil solução (BECK-SAGUE e JARVIS 1993; REX et al., 2000; CHEN et al.; 2007).

A terapia contra infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* é de difícil tratamento devido ao número limitado de agentes antifúngicos disponíveis.

A anfotericina B (Figura 1), droga pertencente à classe dos polienos age ligando-se aos esteróis, preferencialmente ao principal esteroide da membrana celular fúngica, o ergosterol. Essa ligação propicia a alteração da integridade da membrana fúngica e causa desequilíbrio osmótico, resultando na perda de potássio intracelular, magnésio, açúcares, e de outros metabólitos, levando a morte celular (TERRELL e HUGHES, 1992; CHEN et al.; 2007). Apesar de ser a droga de primeira escolha no tratamento das infecções causadas pelo gênero *Candida*, esta substância está associada a vários efeitos tóxicos e requer administração intravenosa (GOODWIN et al., 1995)

A flucitosina (Figura 1) é a única droga antifúngica do tipo antimetabólito. Trata-se quimicamente de uma pirimidina, a qual dentro das células fúngicas sofre uma desamilação responsável por sua ativação, transformando-se em 5-fluorouracil. Ela inibe a síntese protéica fúngica, substituindo uracila pelo 5-fluorouracil no RNA. Flucitosina também interfere na síntese do DNA fúngico. A sua formulação intravenosa não está mais disponível e é limitada pela sua toxicidade na medula óssea e elevada taxa de mutação espontânea levando a resistência microbiana (BENNETT, 1977; ANDES e OGTRIO, 2000).

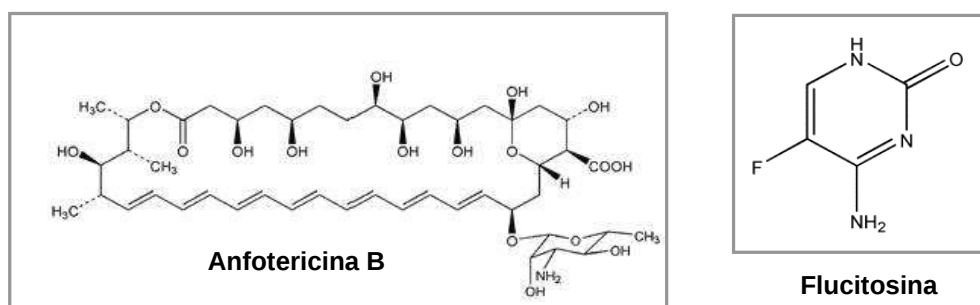


Figura 1. Estrutura molecular dos antifúngicos anfotericina B e flucitosina

Com o lançamento dos azóis, nova classe de antifúngicos com disponibilidade de administração oral, o tratamento de infecções por *Candida* spp começou uma nova era (SAAG e DISMUKES, 1988). Essa classe de medicamentos tem como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol que é o principal esteroide presente na membrana da célula fúngica (figura 2).

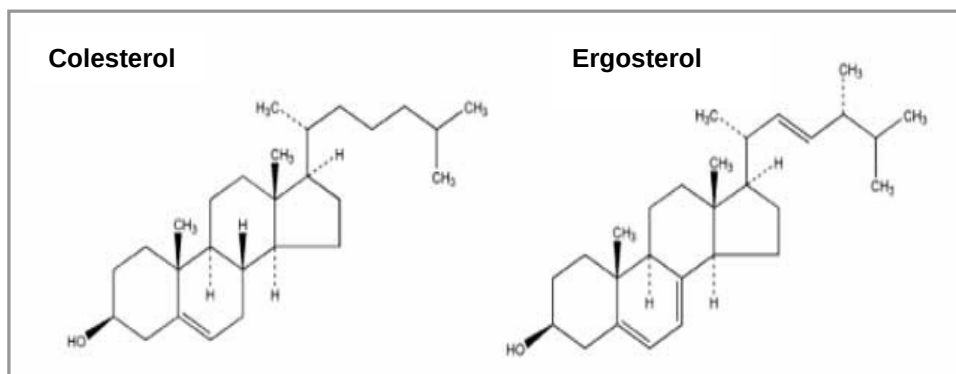


Figura 2. Estrutura molecular do colesterol e ergosterol.

Especificamente, os azóis inibem a atividade da enzima do citocromo P450, lanosterol 14 α -desmetilase (VERMITSKY et al., 2006). O cetoconazol foi o primeiro agente disponível para o tratamento de candidíase mucocutânea, entretanto com algum tempo de uso foram relatadas falhas terapêuticas associadas aos valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM) (HORSBURGH e KIRKPATRICK, 1983). A próxima droga a ser introduzida foi fluconazol (Figura 3), triazol solúvel em água com biodisponibilidade superior a 90% após administração oral, amplamente utilizado para tratamento de uma vasta gama de infecções causadas por *Candida*, particularmente em indivíduos HIV positivos com candidíase orofaríngea (SAAG e DISMUKES, 1988). Concomitante com a sua utilização generalizada, em 15 milhões de pacientes desde 1988, tem havido relatos de resistência ao fluconazol (figura 3). Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelos fungos é importante ressaltar a superprodução de enzimas, a implementação de vias metabólicas alternativas e a produção de bombas de efluxo que expulsam o medicamento da célula fúngica (WHITE et al., 1998; GOLDMAN et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; ESPINEL-INGROFF, 2008).

Outros exemplos de substâncias pertencentes à classe dos azóis são itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, esta última substância está na fase II dos testes clínicos, todas agem na síntese do ergosterol, entretanto em diferentes etapas da cascata de síntese (CHEN e SORRELL, 2007).

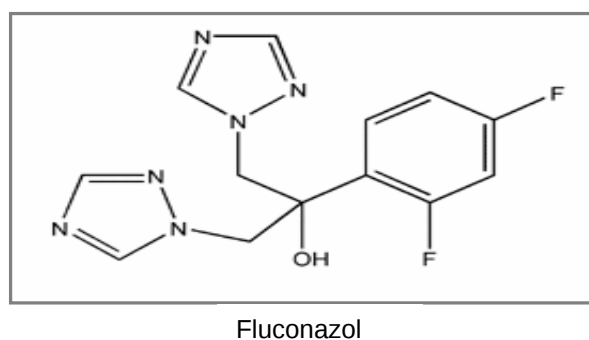


Figura 3. Estrutura molecular do antifúngico fluconazol

C. albicans geralmente é sensível a todos os agentes antifúngicos disponíveis. Entre as espécies não-*albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são também sensíveis aos azóis, entretanto *C. tropicalis* possui sensibilidade menor ao fluconazol que *C. albicans*. *C. lusitanae*, responsável por 1–2% das candidemias é susceptível aos azóis, contudo possui alta resistência intrínseca a anfotericina B (SINGH, 2001; COSTA-DE-OLIVEIRA et al, 2008; CRUCIANI e SERPELLONI, 2008). Por outro lado, *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e *C. glabrata* desenvolve resistência rapidamente após contato com este fármaco. Ambas têm emergido como importantes agentes em infecções sistêmicas em pacientes hospitalizados (REX et al., 1995; SPELLBERG et al., 2006). No entanto, seus mecanismos moleculares de resistência ainda são poucos explorados e necessitam maiores investigações (GUINEA et al., 2006; ROGERS et al., 2006).

Novas drogas antifúngicas tornaram-se disponíveis visando o tratamento nos casos de infecção por cepas menos sensíveis ou resistentes. Essa nova classe de drogas, as equinocandinas, age inibindo a síntese de glucana presente na parede celular dos fungos por meio da inibição da enzima $\beta(1,3)$ -glucana sintase (Figura 4). A inibição desta enzima resulta em esgotamento dos polímeros de glucana na célula fúngica, resultando em uma parede celular anormal, fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico. Toxicidade associada à equinocandina é rara, pois sua ação é específica sobre a glucana presente na parede celular, e as células de mamíferos não possuem essa estrutura (CHEN e SORRELL, 2007)

As plantas são utilizadas desde os primórdios da civilização para tratamento e cura de enfermidades sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias. Estas têm contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica, através do isolamento de substâncias bioativas, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias. (YUNES et al., 2001; HOLETZ et al., 2002; MACIEL et al., 2002; ROJAS et al., 2006).

A ampla biodiversidade presente no território brasileiro nos coloca em posição estratégica para o desenvolvimento da exploração racional e sustentável de novos metabólitos de valor terapêutico. A grande extensão territorial do país, com uma enorme diversidade de climas e solos, favorece a biodiversidade e diversidade química. Determinadas áreas como a floresta Amazônica e Atlântica, o Cerrado e a Caatinga são ricos em espécies que podem fornecer compostos naturais ativos para uma variedade de enfermidades como doenças crônicas degenerativas, malária, tuberculose, micoses e muitas outras (BASSO et al., 2005).

Pesquisas de novos agentes antibacterianos e antifúngicos obtidos a partir de extratos de plantas se intensificaram devido ao arsenal relativamente pequeno de drogas disponíveis para o tratamento das micoses principalmente, além da problemática envolvendo cepas resistentes (BARRET, 2002). Estudos com plantas brasileiras provenientes do Cerrado (*Hyptis ovalifolia* e *Eugenia uniflora*) mostraram boa atividade contra dermatófitos e dentre estes, *Trichophyton rubrum* apresentou sensibilidade alta (SOUZA et al., 2003). Dois componentes puros isolados da *Wedelia paludosa*, planta nativa do Brasil e tradicionalmente usada na medicina popular apresentaram atividade contra os dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (SARTORI, 2003). *Bauhinia racemosa* encontrada na Índia, China e Timor, usada no tratamento de cefaléia, problemas de pele e diarreia, apresentou atividade contra bactérias Gram negativas, positivas e também *C. albicans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* (KUMAR et al., 2005). *Camellia sinensis*, o popular chá verde foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana e demonstrou ser ativo contra *C. albicans* e *Streptococcus mutans* (SIMONETTI et al.,

2004.). Isobe et al. (2002), estudando a planta *Pothomorphe umbellata*, conhecida pelo nome popular de pariparoba ou caapeba e usada como analgésico, diurético, antiespasmódico, antiinflamatório, antimalárico e antiasmático, verificaram que esta planta também apresentava ação antimicrobiana. O óleo essencial obtido a partir das sementes dos frutos de *Caryocar brasiliensis*, planta amplamente distribuída nas regiões central e sudeste do Brasil, teve atividade antifúngica comprovada contra *Cryptococcus neoformans* (PASSOS et al., 2002). As plantas *Ziziphus joazeiro* e *Caesalpinia pyramidalis*, usadas popularmente no tratamento de micoses nos estados do Paraná e Sergipe mostraram-se potentes contra os patógenos humanos *T. rubrum*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi* (CRUZ et al., 2007).

Os testes para determinação da atividade antifúngica de produtos naturais, especialmente extratos de plantas apresentam muitos desafios. A diversidade de metodologias e a inexistência de padronização para as condições do teste como a concentração do inóculo e meio de cultura podem levar a falta de reprodutibilidade e dificuldade na comparação intra e interlaboratoriais. Além disso, o fenômeno de *trailing*, crescimento residual ou inibição parcial do crescimento, que ocorre com leveduras do gênero *Candida* tornam difícil a determinação pontos de corte (LIU et al., 2007). Contudo a padronização de testes de sensibilidade *in vitro* apresentou grandes avanços em anos recentes, principalmente devido à publicação de documentos de referência pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - CLSI a respeito de metodologias testadas, padronizadas e revisadas por consenso. Os documentos M27-A2 do CLSI recomendam a microdiluição em caldo como método de referência para testar sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* e o documento M38-A para fungos filamentosos que causam infecções invasivas incluindo espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii*. Estes documentos foram preparados para drogas antifúngicas sintéticas. No entanto, muitos estudos ainda empregam metodologias não validadas. Nos últimos anos, o teste de microdiluição foi usado e recomendado para a determinação da atividade antifúngica de produtos naturais por serem mais sensíveis, econômicas e requererem pequenas quantidades de amostras

(LEE, 1999; LI et al., 2003; LARCHER et al., 2004; SALGUEIRO et al., 2004). Estudos recentes têm substituído o método tradicional de difusão em ágar pela técnica de microdiluição (BOUAMAMA et al., 2006, BUWA e STADEN, 2006; MOTSEI et al., 2003; SCORZONI et al., 2007 a; SCORZONI et al., 2007 b).

As proteínas são os principais alvos de drogas. A evolução das técnicas proteômicas reveste-se de grande importância para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Por meio destas técnicas é possível identificar a mudança de expressão de um determinado sistema em estado patológico ou quando exposto a uma substância sendo útil para estudar os alvos e os mecanismos de ação das substâncias testadas (WALGREN e THOMPSON, 2004).

O termo proteoma foi primeiramente usado em 1995 e foi definido como uma caracterização em grande escala de um amplo conjunto de proteínas de uma linhagem celular, tecido ou organismo (WASINGER et al, 1995; ANDERSON et al, 1996). Hoje duas definições são aceitas: a primeira e clássica é restrita a análises em grande escala dos produtos dos genes e a segunda é mais ampla e combina a análise das proteínas com estudos genéticos envolvendo transcritos (mRNA). No entanto, a meta dos estudos proteômicos continua a mesma: obter uma visão global e integrada da biologia de um sistema por meio do estudo das proteínas (PANDEY e MANN, 2000).

Os primeiros estudos que podemos chamar de proteoma começaram em 1975 com a introdução da eletroforese bidimensional por O' Farrell, Klose, e Scheele, mapeando proteínas de *Escherichia coli*, rato e cobaio. Muitas proteínas foram separadas e visualizadas, mas nenhuma foi identificada. Apesar de o desenvolvimento da eletroforese bidimensional ser um grande passo para a ciência proteômica, a identificação dessas proteínas era necessária. O principal problema a ser solucionado era a falta de sensibilidade das técnicas de sequenciamento, isso porque tanto a eletroforese unidimensional como a bidimensional possuem limites na quantidade de proteína adicionada (AEBERSOLD, 1986, 1987, 1988). A primeira tecnologia a emergir foi a degradação de Edman (EDMAN, 1949), sendo possível com isso a criação de banco de dados de eletroforese bidimensional. Algumas décadas mais tarde, a espectrometria de massas trouxe avanços na identificação

protéica com grande sensibilidade e precisão (ANDERSEN e MANN, 2000). O crescimento da proteômica é uma consequência direta dos avanços no seqüenciamento genômico, sem essas informações as proteínas não poderiam ser identificadas, mesmo com as melhorias introduzidas pela espectrometria de massas (PANDEY e LEWITTER, 1999).

Assim, a proteômica é uma tecnologia emergente, sendo uma poderosa ferramenta na identificação de biomarcadores de doenças, caracterização de processos fisiológicos normais e patológicos, análise de interação entre as proteínas, desenvolvimento farmacêutico e toxicológico (WESTERMEIER et al, 2005 ; UNWIN e WHETTON, 2007).

O proteoma dos fungos é estudado para diversas finalidades. Rupp (2004) analisou a parede celular de *C. albicans* investigando a resposta a drogas e mudanças nos fatores de virulência em mutantes obtendo informações importantes para o entendimento das interações fungo-hospedeiro. Outras análises do proteoma de *C. albicans* foram focadas no dimorfismo, fatores de virulência e resistência a drogas (PITARCH et al., 2003). Pitarch e colaboradores (2004) mapearam as proteínas imunogênicas de *C. albicans*, reconhecidas por anticorpos no curso da infecção sistêmica na busca de novos biomarcadores que pudessem ajudar no diagnóstico e monitoramento terapêutico dessa micose. Isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes aos azólicos tiveram sua análise protéica comparada e significativa diferença foi observada na expressão dos dois isolados (MARICHAL et. al., 1997). A análise proteômica de componentes de superfície de *A. fumigatus* identificou vinte seis proteínas, entre elas, a principal proteína presente nos conídios, possivelmente os principais causadores do processo alérgico, sendo assim, essas proteínas seriam grandes candidatas a produção de vacinas (ASIF et. al., 2006). Modificações no proteoma de *C. albicans* foi observado quando esta levedura foi tratada com droga inibidora da β -(1,3)-glucana sintetase, semelhante as equinocandinas e também com dois triazóis mostrando que por meio de estudos proteômicos é possível distinguir diferentes mecanismos de ação de antifúngicos (BRUNEAU et al., 2003). Outros proteomas além do fúngico foram estudados, Caledelari e colaboradores (2000) com o objetivo de entender os mecanismos de

resistência de *Streptococcus gordonii* à penicilina analisaram seu proteoma por eletroforese bidimensional e verificaram que o microrganismo resistente apresentou duas proteínas com intensidade aumentada, as quais mostraram relação com resistência a penicilina. O perfil protéico de *Mycobacterium avium* foi avaliado durante a infecção mostrando que um conjunto de dez proteínas teve sua expressão aumentada, duas dessas tem papel na produção de energia (HUGHES et al., 2007). Os estudos em proteomas virais são focados no entendimento dos efeitos do vírus no hospedeiro (SEIPELT et al., 2000). Os vírus foram estudados durante muito tempo não só para o entendimento da patologia causada por eles, mas também como sistemas-modelo para processos moleculares bem como ferramentas para identificar proteínas reguladoras celulares importantes. Recentes avanços em técnicas proteômicas e espectrometria de massa facilitaram a detecção dos componentes do virion, interações protéicas com células infectadas além de mudanças induzidas do proteoma celular resultando em um melhor entendimento mais da infecção virótica (MAXWELL e FRAPPIER, 2007). Em relação aos parasitas, *Trichomonas vaginalis*, protozoário transmitido por via sexual, que infecta a área urogenital humana causando a tricomoníase, teve seu primeiro mapa de referência proteômico descrito (DE JESUS et al., 2007). As pesquisas são facilitadas nesses organismos, em razão de seu proteoma ser relativamente pequeno, além disso, muitos já foram descritos, baseando-se em estudos avançados de seqüências genômicas. Como resultado do seqüenciamento gênico e análise proteômica muitos genes e proteínas estão sendo descritos e disponibilizados para serem estudados como novos alvos para drogas (FERNANDES, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Assim, no presente estudo, foi realizada prospecção da atividade antifúngica de extratos, frações e substâncias isoladas de plantas. Extratos com atividade antifúngica e com valores baixos de concentração inibitória mínima (CIM) foram selecionados e foi verificado o perfil de proteínas antes e após o contato com o extrato vegetal. A importância dessa análise pode gerar a identificação de alvos interessantes na pesquisa de antifúngicos como também fornecer novas evidências para o entendimento do papel dessas proteínas nos mecanismos de resistência e de patogenicidade do microrganismo.

3. OBJETIVOS

- Realizar estudo da atividade antifúngica de extratos e substâncias das plantas, *Alibertia edulis*, *Alibertia sessilis*, *Alibertia macrophylla*, *Cryptocarya mandioccana* e *moschata*, *Kielmeyera rubriflora*, *Machaerium villosum*, *Peperomia obtusifolia* por meio de técnicas adaptadas e padronizadas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) baseadas nas preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLS contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*.
- Determinar a concentração fungicida mínima (CFM) e selecionar os extratos com atividade antifúngica e com valores de CIM baixos para as duas leveduras;
- Realizar análise diferencial do perfil protéico das leveduras quando em contato com substância de origem vegetal previamente escolhida que apresentou atividade antifúngica, bem como a droga sintética fluconazol, em busca de possíveis alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

Para a realização dos testes foram empregadas as leveduras *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258, pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud sem a adição de cloranfenicol, incubadas a temperatura ambiente por 24 horas.

4.2. Preparo das substâncias vegetais

Para a obtenção dos extratos, as folhas, galhos ou raízes das plantas foram secas e moídas e, em seguida, submetidas a processos de extração e partição com solventes orgânicos fornecendo as frações de diversas polaridades a serem estudadas. As frações selecionadas foram submetidas a diferentes técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna sobre sílica ou Sephadex LH-20, cromatografia em camada delgada, além da cromatografia líquida de alta eficiência visando o isolamento e purificação de substâncias. A determinação das estruturas químicas dos componentes puros foi realizada por análises espectrométricas.

4.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1996). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. A concentração da suspensão fúngica foi de 1×10^4 – 5×10^4 UFC/mL. Foram utilizadas duas drogas sintéticas anfotericina B e fluconazol como controle do teste. Foram realizadas leituras visuais após 24 horas de incubação. A concentração inibitória mínima é considerada a menor em que se observou a inibição do crescimento fúngico. Os extratos que apresentaram um CIM menor que 75, µg/mL

a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250 µg/mL, fraca e maior que 250 µg/mL inativo (SCORZONI et al., 2007).

4.4. Concentração fungicida mínima

Após o tempo de incubação, uma alíquota de cada um dos 96 poços da placa de microdiluição foi retirada e colocada cuidadosamente em ágar Sabouraud contido em placas grandes. Após 24 horas de incubação a 35°C, foi verificado o crescimento ou não de colônias e as respectivas concentrações.

4.5. Seleção dos extratos

Para a análise diferencial do perfil protéico das leveduras foram selecionados extratos que apresentaram atividade antifúngica com baixos valores de CIM tanto para *C. albicans* como para *C. krusei*.

4.6. Tratamento das células fúngicas e extração das proteínas

As leveduras foram cultivadas em meio YEPD na concentração de 1×10^4 – 5×10^4 UFC/mL até atingirem a fase *log* da curva de crescimento, então os extratos foram adicionados na concentração de 1000µg/mL ficando em contato por 16 horas, o mesmo foi realizado com fluconazol na concentração de 1400 µg/mL. Essas concentrações dos extratos e do fluconazol foram usadas, pois segundo Bruneau et al., 2003, concentrações a partir de 750 µg/mL correspondem a quantidade necessária para verificar os efeitos de alterações protéicas e identificações do possível mecanismo de ação. Concentrações mais baixas dos extratos (250 e 500 µg/mL) também foram testadas, entretanto não foram observadas modificações relevantes nos perfis protéicos, portanto elegeu-se 1000µg/mL a concentração de extrato para o teste e 1400 µg/mL a de fluconazol. O cultivo foi centrifugado e lavado de 3 a 5 vezes com água gelada para a retirada do meio de cultura e do extrato. O pellet foi acrescido de solução 10mM Tris – HCl e macerado com nitrogênio líquido, a seguir centrifugado por 40 minutos 13.000 g.

3.7. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas foram submetidas à dosagem pelo método de Bradford (1976). Os perfis protéicos foram analisados quanto a sua alteração após a exposição à droga vegetal por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de Laemmli, (1970) e Studier, (1973).

3.8. Análise protéica por Eletroforese Bidimensional

Os componentes protéicos dos isolados foram primeiramente submetidos à focalização isoeletrica, utilizando Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão, realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12.5% de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250 segundo Neuhoff et al. (1988). A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa 2D Platinum da GE.

5. Resultados

5.1. Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica de extratos e substâncias das plantas, *Alibertia edulis*, *Alibertia sessilis*, *Alibertia macrophylla*, *Cryptocarya mandioccana* e *moschata*, *Kielmeyera rubriflora*, *Machaerium villosum*, *Peperomia obtusifolia*, foi realizada pela técnica de microdiluição segundo o documento M27-A do CLSI, visando obter os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e também determinar a concentração fungicida mínima (CFM) conforme dados das tabelas 1 a 8.

Tabela 1: Valores de CIM e CMF de *Alibertia sessilis*, pertencente à família Rubiaceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Planta	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Alibertia sessilis</i>	Extrato bruto etanólico	250	250	15,6	31,2
	Fração AcOEt	250	250	31,2	62,5
	AsFH (bruto)	125	250	250	250
	AsFA (bruto)	250	250	125	125
	AsFB (bruto)	250	250	125	125
	AsCAC2 (fração)	125	250	125	250
	AsCAC4 (fração)	125	250	125	250
	AsCaC5i (fração)	250	250	250	250
	AsCBf (fração)	125	250	15,6	250
	AsCB2-4 (fração)	250	250	125	250
	AsCB5-6 (fração)	250	250	125	250
	AsCHDA (bruto)	250	250	125	250

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

Alibertia sessilis apresentou valores elevados de CIM e de CFM contra *C. albicans* tanto para extratos brutos como também para as frações, com atividade antifúngica variando de moderada a fraca. Resultados semelhantes foram obtidos para *C. krusei*, com exceção do extrato bruto etanólico apresentando forte atividade antifúngica com valor de CIM de 15,6 µg/mL e CFM de 31,2 µg/mL e as frações AcOEt e AsCBf com valores de CIM de 31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL.

Tabela 2: Valores de CIM e CMF de *Alibertia macrophylla*, pertencente à família Rubiaceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Planta	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Alibertia macrophylla</i>	Extrato Bruto Etanólico	SA	SA	62,5	250
	Fração Hexânica	SA	SA	SA	AS
	Fração Metanólica	SA	SA	250	250
	AmFH (bruto)	125	250	125	250
	AmFA (bruto)	250	250	125	125

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

Dois extratos brutos de *Alibertia macrophylla* apresentaram atividade contra *C. albicans*, AmFH e AmFA, sendo seus valores de CIM 125 µg/mL (atividade moderada) e 250 µg/mL (atividade fraca). Em relação a *C. krusei*, a melhor atividade antifúngica foi do extrato bruto etanólico, com valor de CIM e de CFM de 62,5 e 250 µg/mL respectivamente. Para os outros extratos brutos e frações a atividade antifúngica variou entre moderada e inativa.

Tabela 3: Valores de CIM e CMF de *Alibertia edulis*, pertencente à família Rubiaceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*

Planta	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Alibertia edulis</i>	Extrato bruto etanólico	125	250	15,6	250
	Fração Hexânica	SA	SA	250	250
	Fração AcOEt	250	250	15,6	250
	AeFH (bruto)	250	250	250	250
	AeFA (bruto)	250	250	250	250
	AeFHDA (bruto)	250	250	125	250
	AeC45Me (Fração)	125	250	125	250
	AeC5SAC (Fração)	250	250	62,5	125
	AeC5SHO (Fração)	250	250	125	250
	AeC5in (Fração)	125	250	31,2	250
	AeC6p (Fração)	125	250	31,2	62,5

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

Os extratos brutos e frações de *Alibertia edulis* apresentaram-se inativos ou com atividade antifúngica moderada para *C. albicans*. Melhores resultados foram

obtidos para *C. krusei* com grande parte dos extratos brutos e frações apresentando atividade variando entre forte e moderada.

Tabela 4: Valores de CIM e CMF de *Machaerium villosum*, pertencente à família Leguminosae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Planta <i>Machaerium villosum</i>	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
	Extrato ETOH Bruto	SA	SA	125	250
	Fração Hexano	250	250	250	250
	Fração AcOEt	250	250	125	125
	Fração N- Butanol	250	250	250	250
	Fração Hidroalcoólica	SA	SA	SA	SA

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

Machaerium villosum apresentou atividade de moderada a fraca contra as duas leveduras com valores de CIM e CFM variando de 125 a 250 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5: Valores de CIM e CMF de *Cryptocarya mandioccana* e *moschata*, pertencente à família Lauraceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Planta	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CMF ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CMF ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Cryptocarya mandioccana</i> e <i>moschata</i>	FAR1 (Pura)	125	125	125	250
	FAR2 (Pura)	125	250	125	250
	FAR3 (Pura)	125	250	125	250
	FAR5 (Pura)	125	250	125	250
	FAR6 (Pura)	125	250	125	250
	FAR7 (Pura)	125	250	125	250
	FAR8 (Pura)	125	250	125	250
	FAR9 (Pura)	125	250	125	250
	FAR10 (Pura)	125	125	125	250
	FAR12 (Pura)	SA	SA	125	250
	FAR13 (Pura)	SA	SA	125	250
	FAR14(Pura)	125	250	125	250
	FAR15 (Pura)	125	250	125	250
	FAR16 (Pura)	125	250	125	250
	FAR17 (Pura)	125	250	125	250
	FAR19 (Pura)	250	250	125	250
	FAR20 (Pura)	250	250	125	250
	FAR21 (Pura)	250	250	125	250
	FAR22 (Pura)	250	250	125	250
	FAR23 (Pura)	250	250	125	250

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

Os testes realizados com as substâncias puras de *Cryptocarya mandioccana* e *moschata* revelaram atividade antifúngica moderada a fraca.

Tabela 6: Valores de CIM e CMF de *Peperomia obtusifolia*, pertencente à família Piperaceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Planta <i>Peperomia obtusifolia</i>	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
	Extrato Bruto (folhas)	125	125	62,5	62,5
	Fração Hexânica (folhas)	62,5	62,5	31,2	31,2
	Fração Hexano/Acetato (folhas)	SA	SA	250	250
	Fração MEOH/H ₂ O (folhas)	SA	SA	250	250
	Fração AcOEt (folhas)	SA	SA	250	250
	Fração Hexânica (caules)	SA	SA	125	125
	Fração Hexânica (caules)	SA	SA	250	250
	Fração Hexano/Acetato (caules)	250	250	125	125
	Fração Hexano/Partição (caules)	250	250	62,5	62,5
	Fração Hidro/AcOEt (caules)	250	250	15,6	15,6

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

A fração hexânica de folhas *Peperomia obtusifolia* destaca-se por apresentar boa atividade antifúngica para as duas leveduras, além disso, o extrato bruto das folhas fração Hexano/ Partição e a Fração Hidro/ AcOEt dos caules apresentaram também forte atividade antifúngica para *C. krusei*. Os outros extratos e frações de folhas e caules testados apresentaram valores altos de CIM e CFM sendo considerados com atividade antifúngica moderada a inativos.

Tabela 7: Valores de CIM e CMF de *Peperomia sp*, pertencente à família Piperaceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Planta	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Peperomia sp</i>	Extrato Etanólico F (Bruto)	SA	SA	250	250
	Extrato Etanólico C (Bruto)	SA	SA	250	250
	Partição Hexânica F (Bruto)	SA	SA	250	250
	Partição AcOEt (Bruto)	SA	SA	SA	SA
	Partição Hidroalcoólica (Bruto)	SA	SA	SA	SA
	Extrato Diclorometano (Bruto)	SA	SA	SA	SA
	Extrato MeOH F (Bruto)	SA	SA	SA	SA
	Fr 1-3 (Fração)	SA	SA	SA	SA
	FR 4 (Fração)	SA	SA	SA	SA
	FR5 (Fração)	SA	SA	SA	SA
	Fr 6-10 (Fração)	250	SA	SA	SA
	FR 19-33 (Pura)	SA	SA	SA	SA
	FR34-50 (Pura)	SA	SA	SA	SA

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

Os extratos brutos, frações e substâncias puras de *Peperomia sp* foram todos inativos para *C. albicans*, com exceção da fração Fr 6-10 apresentando atividade antifúngica fraca. Semelhante a *C. albicans*, para *C. krusei* apenas três extratos brutos de *Peperomia sp* apresentaram atividade antifúngica fraca.

Tabela 8: Valores de CIM e CMF de *Kielmeyera rubriflora*, pertencente à família Clusiaceae, testados contra *C. albicans* e *C. krusei*

Planta <i>Kielmeyera rubriflora</i>	Fração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	
		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
	Ext. Bruto Hexano	SA	SA	125	125
	Ext. Bruto AcOEt	31,2	250	7,8	31,2
	Ext. Bruto ETOH	31,2	62,5	7,8	62,5
	Ext. Bruto Soxlet	62,5	250	7,8	62,5
	Xantona 3	15,6	125	0,97	125
	Xantona 5	31,2	250	15,6	250
	Xantona 6	125	250	125	250
	Xantona 8	62,5	250	15,6	125

SA: Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

A atividade antifúngica de *Kielmeyera rubriflora* foi a de maior destaque entre todas as plantas. A maior parte de seus extratos brutos e substâncias puras apresentaram atividade forte e moderada para as duas leveduras, apenas extrato bruto hexânico mostrou-se inativo contra *C. albicans*. As substâncias 3, 5, 6 e 8 correspondem a diferentes xantonas, obtidas do extrato acetato de etila. A substância 3 apresentou valor de CIM menor que os extratos brutos, quando *C. krusei* foi avaliada.

O extrato de caules de *K. rubriflora* após secos e moídos, submetidos a percolação a frio com hexano, acetato de etila e etanol, obtendo assim os extratos brutos hexano, acetato de etila e etanólico. Em seguida foi realizada a extração com soxlet, obtendo assim o extrato soxlet. As xantonas foram obtidas a partir de técnicas cromatográficas a partir do extrato bruto acetato de etia.

5.2. Seleção do extrato para contato com as leveduras de gênero *Candida* e análise proteômica

A análise dos resultados dos valores de CIM e CFM levou à seleção da *Kielmeyera rubriflora* pertencente à família Clusiaceae para realização do contato com as leveduras e posterior análise diferencial da expressão protéica, pois foi a que mais se destacou em relação à atividade, apresentando valores baixos de CIM, sendo considerada de atividade antifúngica potente, tanto para *C. albicans* como para *C. krusei*.

5.3. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os componentes totais de *C. albicans* e *C. krusei* sem tratamento e tratados com 1400µg/mL de fluconazol e 1000µg/mL dos extratos etanólico (EtOH) e acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora* foram analisados por SDS-PAGE. O perfil eletroforético mostrou diferenças principalmente quanto à intensidade e número de bandas. Entretanto esses dados não foram suficientes para uma clara caracterização das proteínas diferencialmente expressas, sendo então, necessária realização da eletroforese bidimensional para uma melhor caracterização.

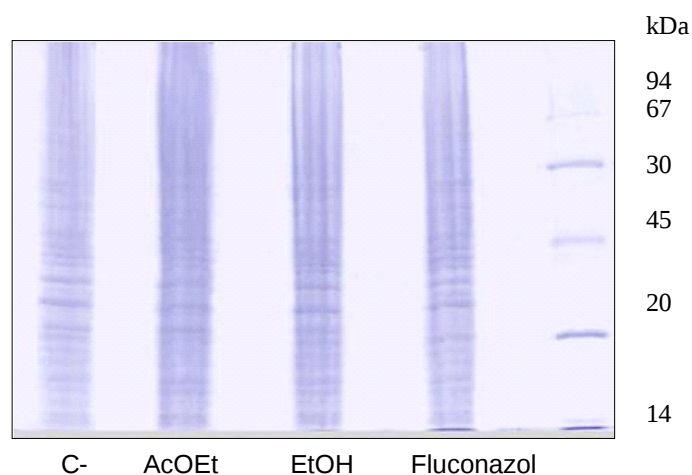


Figura 5: SDS-PAGE dos componentes protéicos de *C.albicans* sem tratamento (C-) e tratada com 1000 µg/mL dos extratos brutos AcOEt e EtOH de *K. rubriflora* e 1400 µg/mL de fluconazol .

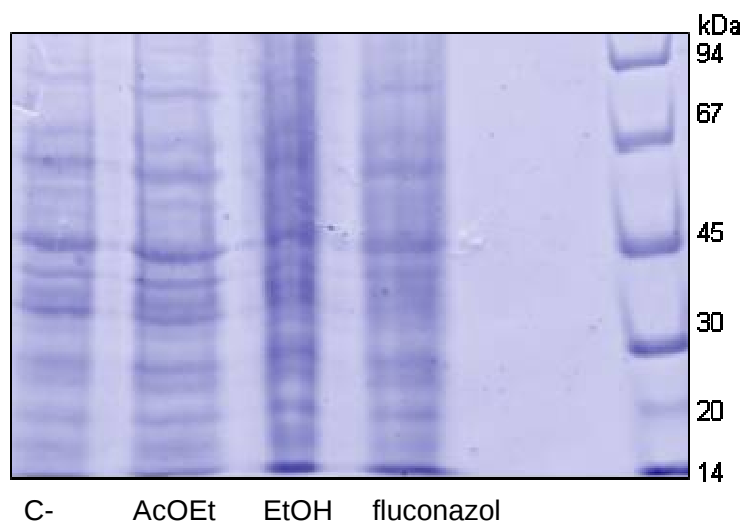


Figura 6: SDS-PAGE dos componentes protéicos de *C. krusei* sem tratament (C-) e tratada com 1000 µg/mL dos extratos brutos AcOEt e EtOH de *K. rubriflora* e 1400 µg/mL de fluconazol .

5.4. Análise protéica por eletroforese bidimensional

5.4.1. *Candida albicans* com e sem tratamento

A eletroforese bidimensional foi realizada com os componentes totais de *C. albicans* sem tratamento, tratada com fluconazol (figuras 7 e 8) e com extratos AcOEt (figuras 9 e 10) e EtOH (figuras 11 e 12) de *K. rubriflora* para verificar a diferença de expressão de proteínas e seus respectivos pontos isoelétricos (pIs). Foram detectadas proteínas na eletroforese bidimensional com massas moleculares entre 103 e 12 kDa e pI entre 4 e 10. A análise diferencial da expressão protéica de *C. albicans* com e sem contato com fluconazol e os extratos vegetais revelou a diminuição e aumento de expressão das proteínas quando em contato. Esses dados estão descritos nas tabelas 9, 10 e 11.

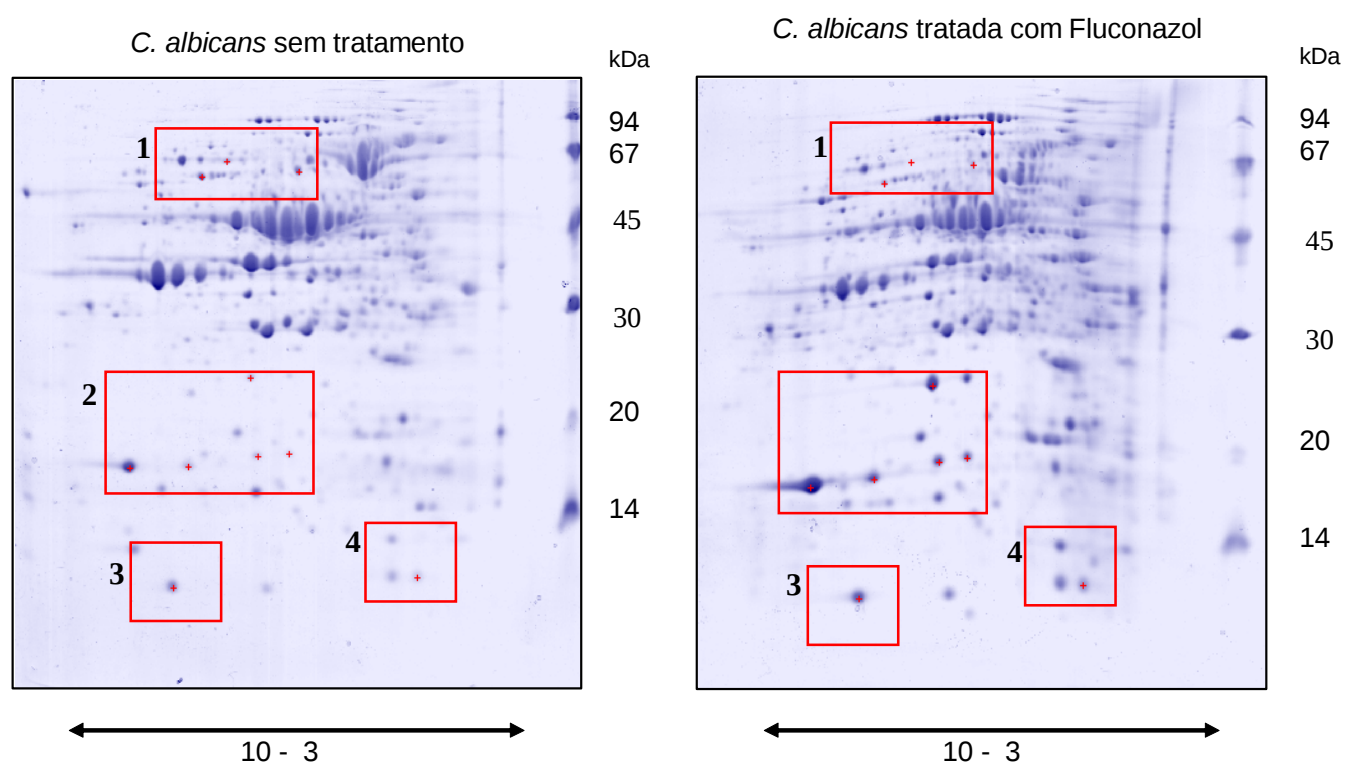


Figura 7: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com fluconazol na concentração de 1400 µg/mL em géis corados pelo azul de Coomassie.

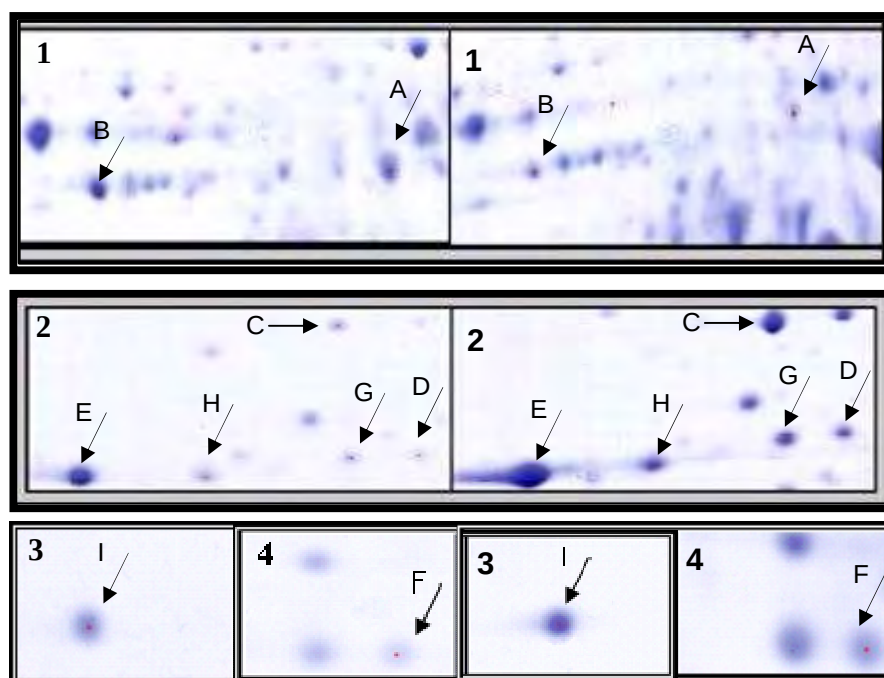
C. albicans em tratamento*C. albicans* tratada com fluconazol

Figura 8: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* com tratamento com fluconazol na concentração de 1400 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.

Tabela 9: Proteínas demonstradas na figura 8 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com fluconazol.

Spot	pI	MM (kDa)	Alteração na expressão
A	5,6	59.1	Diminuição de 3,4 vezes com Fluconazol
B	6,4	56.3	Diminuição de 3,0 vezes com Fluconazol
C	5,8	25.3	Aumento de 9,4 vezes com Fluconazol
D	5,6	19.8	Aumento de 4,6 vezes com Fluconazol
E	8,3	17.3	Aumento de 3,0 vezes com Fluconazol
F	4,6	13,2	Aumento de 3,0 vezes com Fluconazol
G	5,8	19.6	Aumento de 3,8 vezes com Fluconazol
H	6,6	17.4	Aumento de 2,8 vezes com Fluconazol
I	6,7	17.4	Aumento de 2,2 vezes com Fluconazol

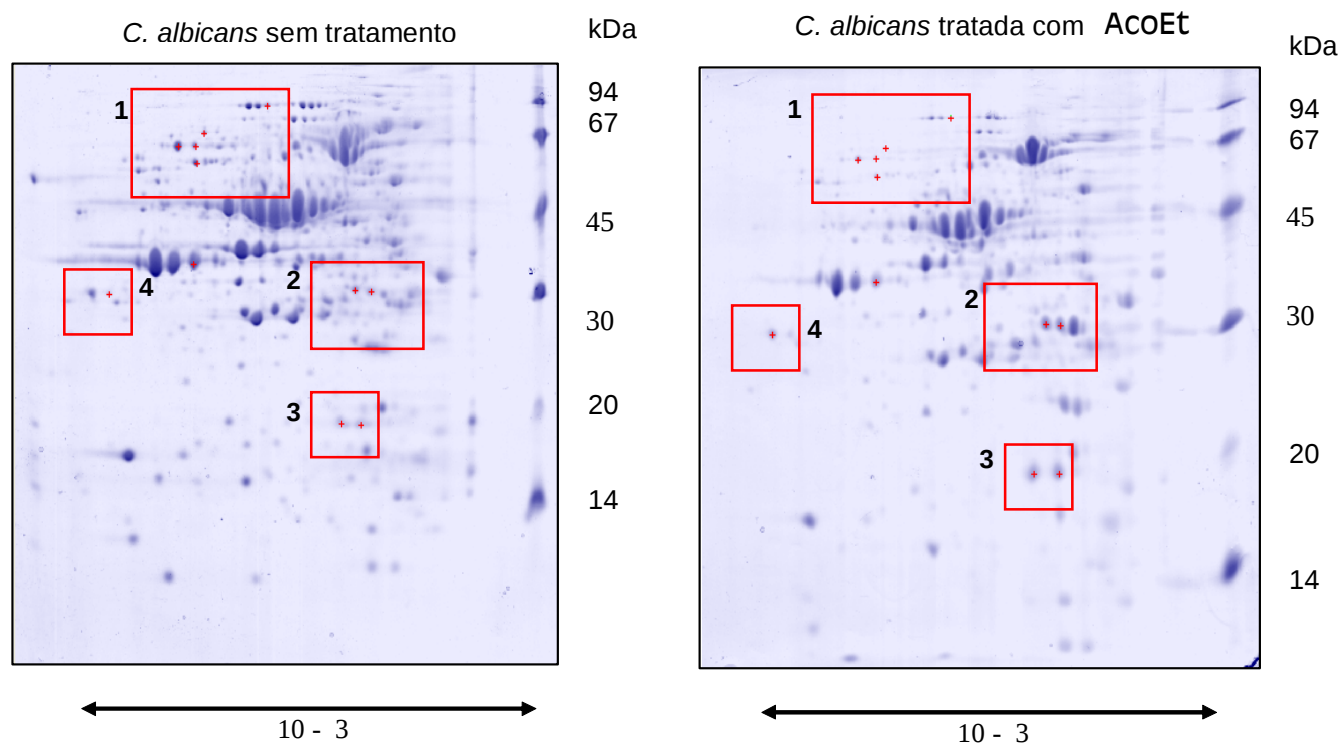


Figura 9: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com o extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie.

C. albicans em tratamento *C. albicans* tratada com AcOEt

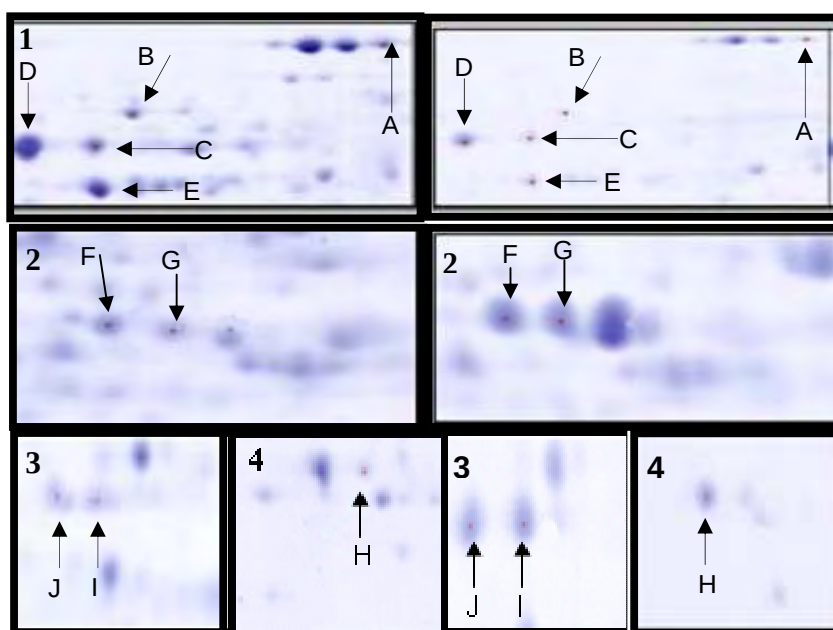


Figura 10: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* com tratamento com o extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora* na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.

Tabela 10: Proteínas demonstradas na figura 10 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com ACOET.

Spot	PI	MM (kDa)	Alteração na expressão
A	5,7	90.5	Diminuição de 3,4 vezes com AcOEt
B	6,3	67.4	Diminuição de 5,1 vezes com AcOEt
C	6,5	62.3	Diminuição de 3,4 vezes com AcOEt
D	6,8	61.8	Diminuição de 3,3 vezes com AcOEt
E	6,4	56.3	Diminuição de 5,3 vezes com AcOEt
F	5,1	29.8	Aumento de 3,8 vezes com AcOEt
G	4,9	29.6	Aumento de 3,5 vezes com AcOEt
H	9,4	29.5	Aumento de 4,8 vezes com AcOEt
I	5,0	18.9	Aumento de 2,2 vezes com AcOEt
J	5,2	18.8	Aumento de 2,3 vezes com AcOEt

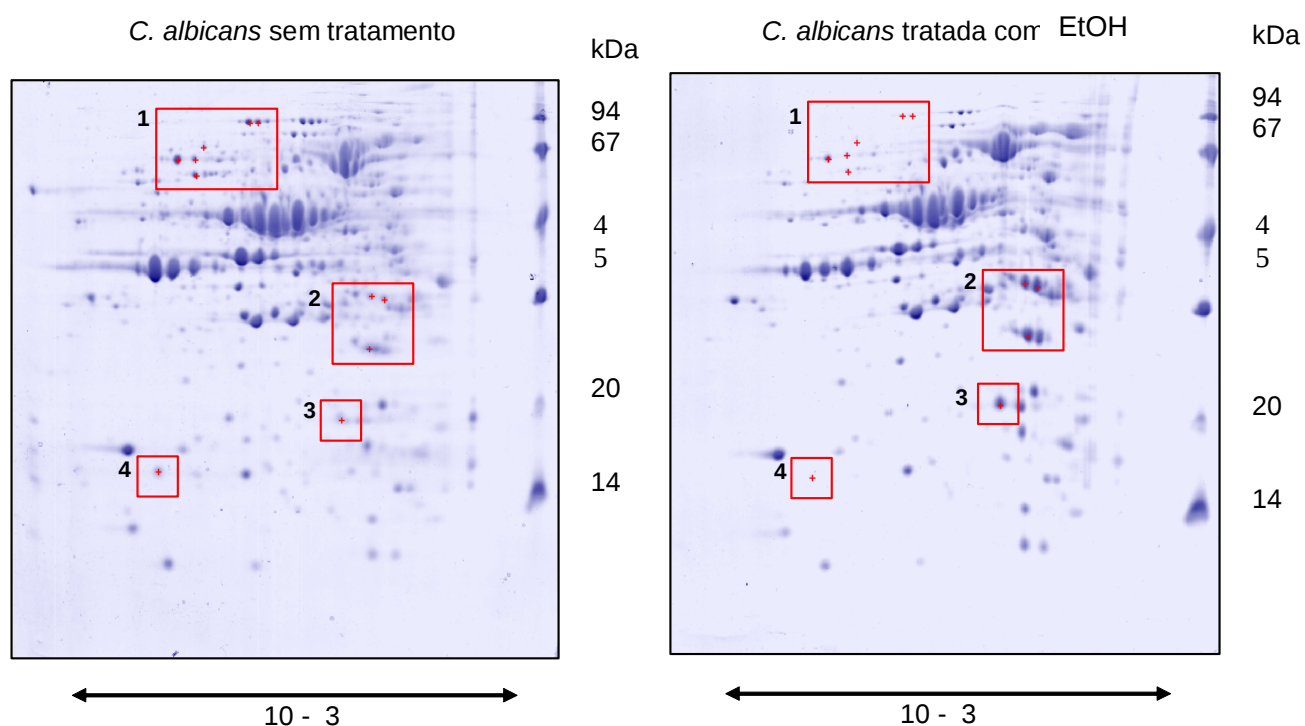


Figura 11: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora* na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie.

C. albicans em tratamento *C. albicans* tratada com EtOH

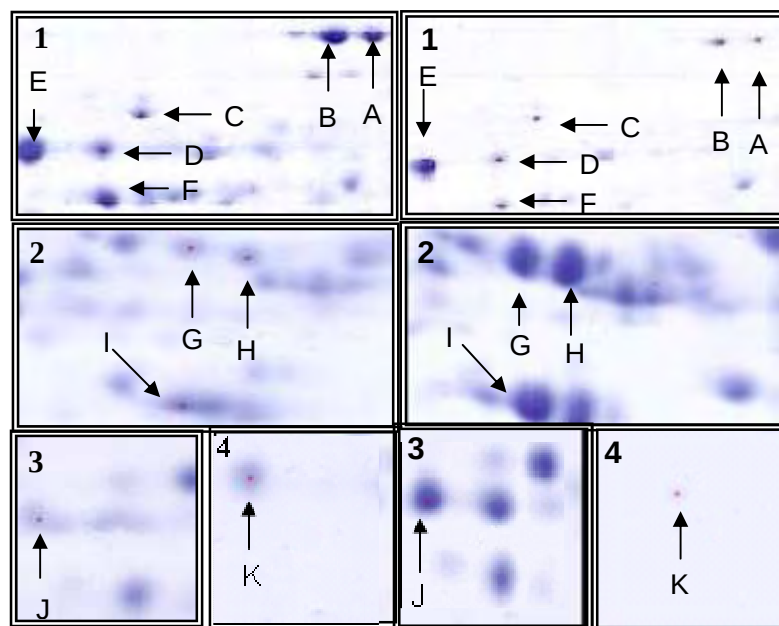


Figura 12: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. albicans* com tratamento com o extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora* na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas.

Tabela 11: Proteínas demonstradas na figura 12 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com EtOH de *K. rubriflora*.

Spot	pI	MM (kDa)	Alteração na expressão
A	5,8	89.2	Diminuição de 8,5 vezes com EtOH
B	5,9	89.2	Diminuição de 6,8 vezes com EtOH
C	6,3	67.4	Diminuição de 4,0 vezes com EtOH
D	6,5	62.2	Diminuição de 3,0 vezes com EtOH
E	6,8	62.3	Diminuição de 2,2 vezes com EtOH
F	6,4	56.3	Diminuição de 5,3 vezes com EtOH
G	4,9	29.8	Aumento de 4,3 vezes com EtOH
H	4,8	33.2	Aumento de 5,3 vezes com EtOH
I	4,9	27.0	Aumento de 3,3 vezes com EtOH
J	5,1	21.3	Aumento de 2,0 vezes com EtOH
K	7,4	16.2	Diminuição de 8,4 vezes com EtOH

5.4.2. *Candida krusei* com e sem tratamento

A análise por eletroforese bidimensional foi também realizada com os componentes protéicos totais de *C. krusei* sem tratamento e comparada com o tratado com fluconazol (figura 13 e 14), com extrato AcOEt (figura 15 e 16) e EtOH (figura 17 e 18) para verificar a diferença de expressão de proteínas e seus respectivos pontos isoelétricos (pIs) e massas moleculares. Foram detectadas proteínas com massas moleculares entre 100 e 14,2 kDa e pI entre 4 e 10. A análise diferencial da expressão protéica de *C. krusei* com e sem contato com fluconazol e os extratos vegetais revelou a diminuição e aumento de expressão das proteínas quando em contato algumas proteínas deixaram de ser expressas com o tratamento com os extratos. Esses dados estão descritos nas tabelas 12 a 16.

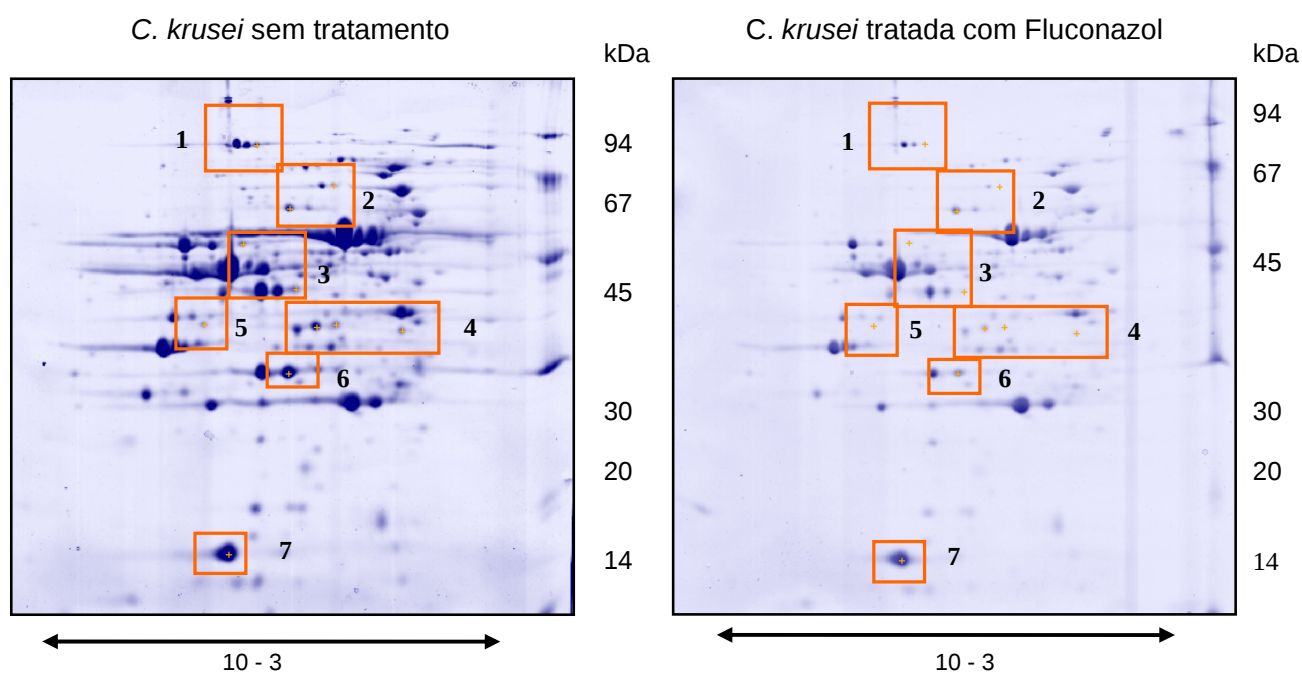


Figura 13: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com extrato fluconazol na concentração de 1400 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie.

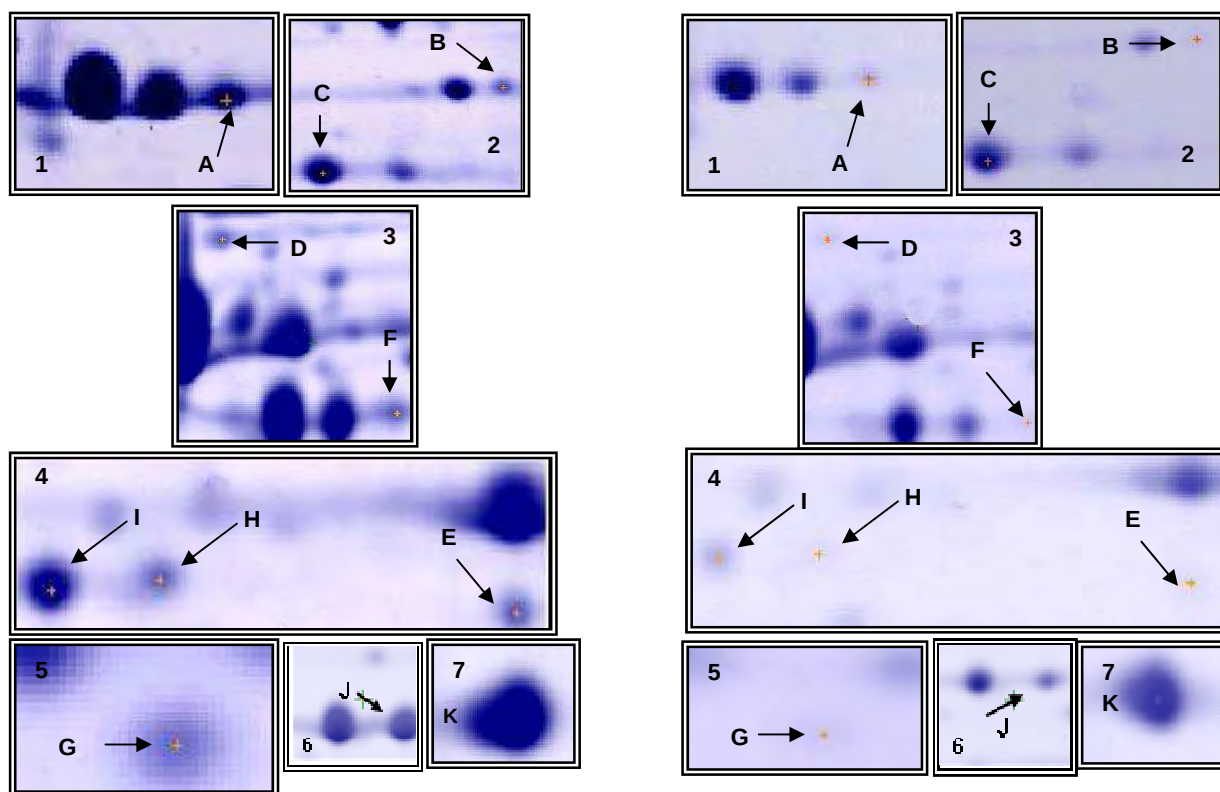


Figura 14: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* com tratamento com o fluconazol na concentração de 1400 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.

Tabela 12: Proteínas demonstradas na figura 14 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com fluconazol.

Spot	PI	MM (kDa)	Alteração na expressão
A	5,8	89,3	Diminuição de 3,8 vezes com Fluconazol
B	5,4	64,9	Diminuição de 3,2 vezes com Fluconazol
C	5,6	56,7	Aumento de 3,8 vezes com Fluconazol
D	5,9	46,1	Diminuição de 3 vezes com Fluconazol
E	4,9	33,6	Diminuição de 2 vezes com Fluconazol
F	5,6	38,5	Diminuição de 2,5 vezes com Fluconazol
G	6,2	34,3	Diminuição de 3,3 vezes com Fluconazol
H	5,3	34,3	Diminuição de 2,5 vezes com Fluconazol
I	5,5	34,0	Diminuição de 2,3 vezes com Fluconazol
J	5,6	29,3	Diminuição de 2,3 vezes com Fluconazol
K	6,0	17,0	Aumento de 2,0 vezes com Fluconazol

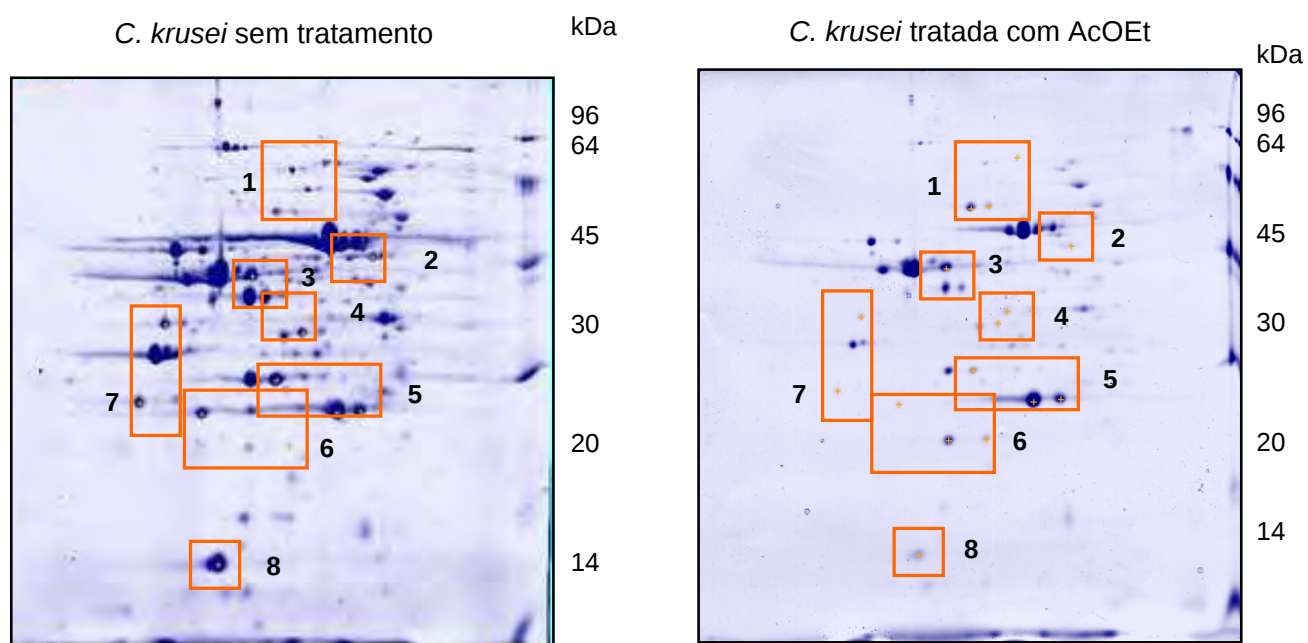


Figura 15: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, em géis corados pelo azul de Coomassie.

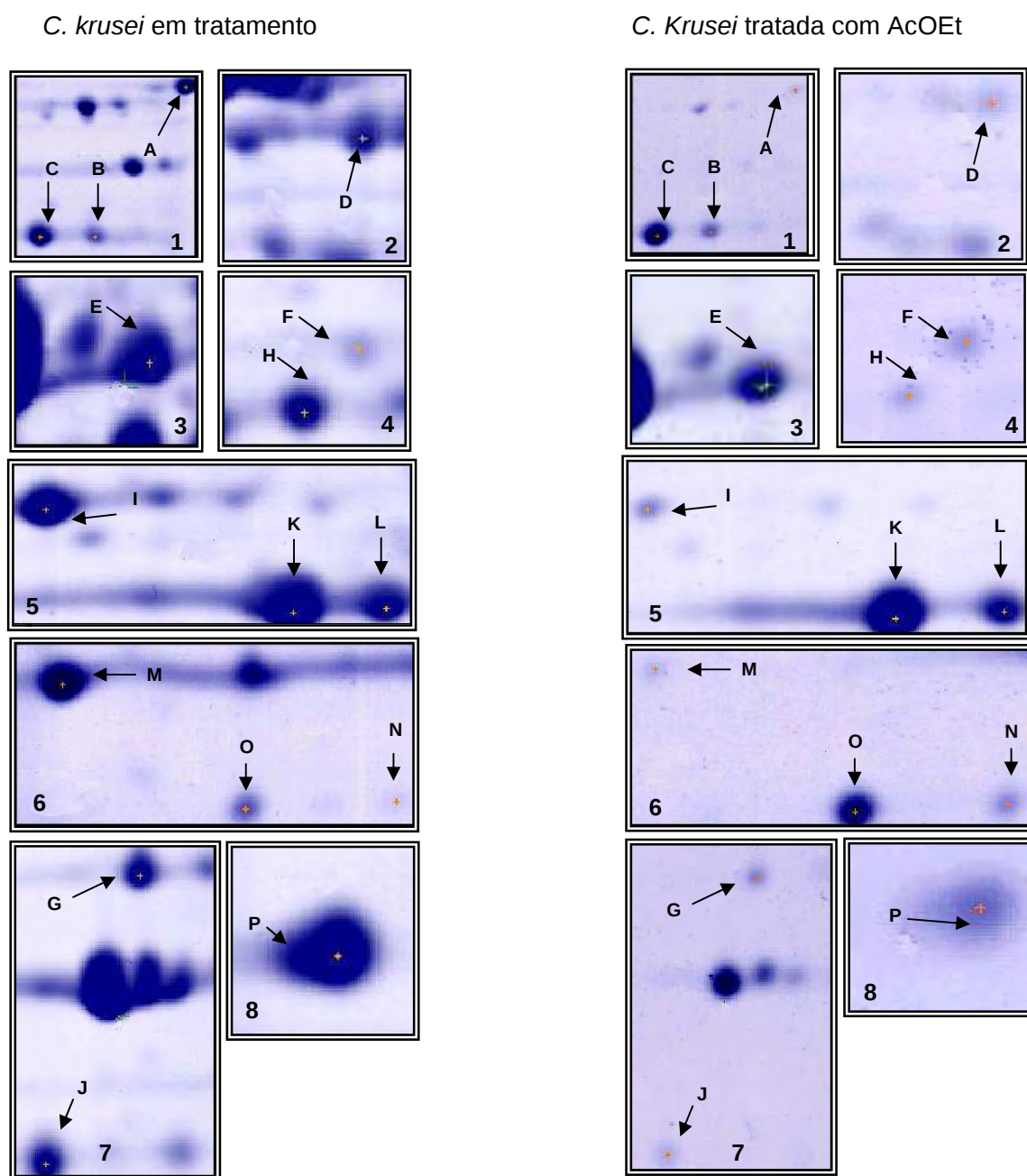


Figura 16: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* com tratamento com extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.

Tabela 13: Proteínas demonstradas na figura 16 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com extrato bruto acetato de etila (AcOEt) de *K. rubriflora*.

Spot	pI	MM (kDa)	Alteração na expressão
A	5,3	79,1	Diminuição de com 3,0 vezes AcOEt
B	5,5	56,7	Aumento de 3,0 vezes AcOEt
C	5,6	56,7	Aumento de 5,0 vezes AcOEt
D	5,0	43,6	Diminuição de 2,3 vezes AcOEt
E	5,8	41,0	Aumento de 2,3 vezes AcOEt
F	5,4	35,5	Aumento de 2,7 vezes AcOEt
G	6,5	35,0	Aumento de 3,0 vezes AcOEt
H	5,5	34,0	Diminuição de 3,0 vezes AcOEt
I	5,6	29,2	Diminuição de 3,0 vezes AcOEt
J	7,1	27,3	Diminuição de 4,0 vezes AcOEt
K	5,3	26,5	Aumento de 3,2 vezes AcOEt
L	5,1	26,6	Aumento de 2,2 vezes AcOEt
M	6,1	26,5	Diminuição de 7,3 vezes AcOEt
N	5,5	24,0	Aumento de 10,3 vezes AcOEt
O	5,8	23,8	Aumento de 10,5 vezes AcOEt
P	6,0	17,0	Diminuição de 2,0 vezes AcOEt

Tabela 14: Proteínas não expressas, após tratamento com o extrato de acetato de etila de *K. rubriflora*

Nº da Proteína	MM	pI
33	89,3	5,8
42	79,1	5,4
44		5,2
49	76,5	4,7
50	75,2	6,7
51		5,5
70	64,9	5,4
73	64,4	5,4
79	63,4	6,0
82	60,3	6,0
142	44,0	5,0
162	42,1	5,5
184	40,2	5,6
185		5,4
187	40,1	5,5
201	38,4	5,6
222	35,2	6,4
223		6,2
227	34,3	6,2
228		5,4
245	31,8	5,7
257	29,6	5,5
263	29,2	8,8
270	27,5	6,4
277	26,8	5,7
278	26,6	5,8
280	26,4	8,8
281	24,0	4,8
282	24,4	6,5
287	23,8	5,1
289	22,0	5,6
293	20,6	5,5
298	19,3	5,6
301		5,6
307	17,8	5,9
309	17,2	5,0
312	17,0	5,7
315	15,6	5,8
316		5,0
317		6,3
319	15,5	6,0
320		5,6
323	14,7	7,5
329	14,1	5,8

Na tabela 14 estão representadas as proteínas não expressas quando *C. krusei* foi tratada com extrato bruto de acetato de etila de *K. rubriflora*, correspondendo a 44 proteínas com pls variando de 4,7 a 8,8 e massa moleculares entre 89.3 e 14.1 kDa

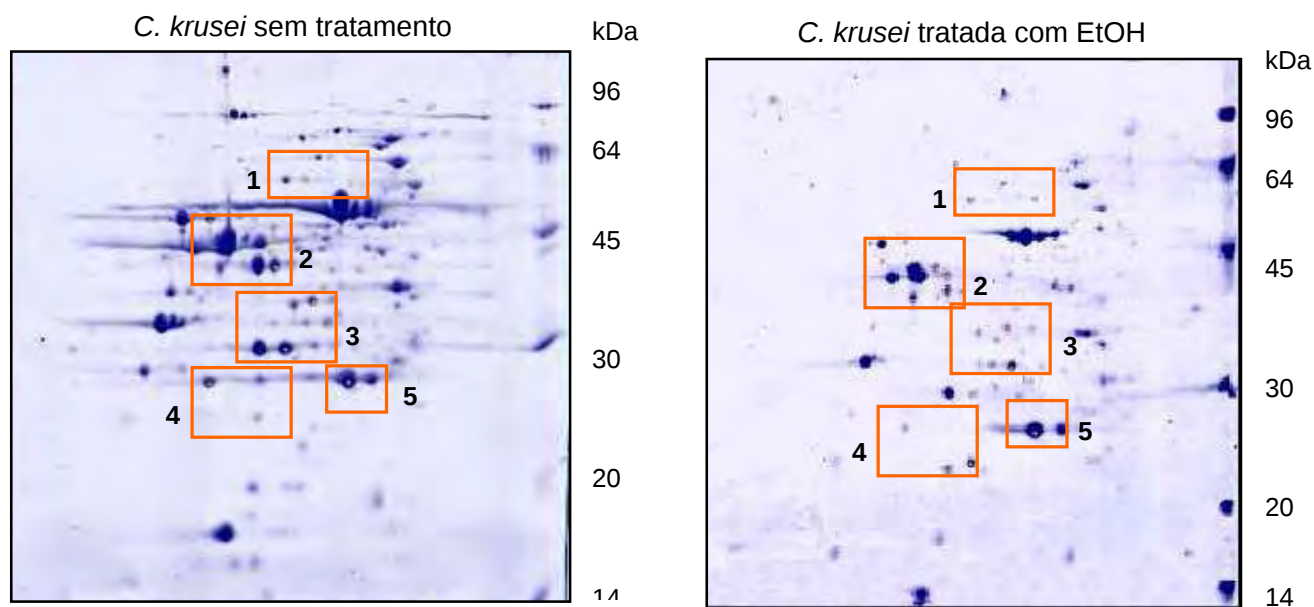


Figura 17: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com Extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora*, na concentração de 1000 µg/mL, em géis corados pelo azul de Coomassie.

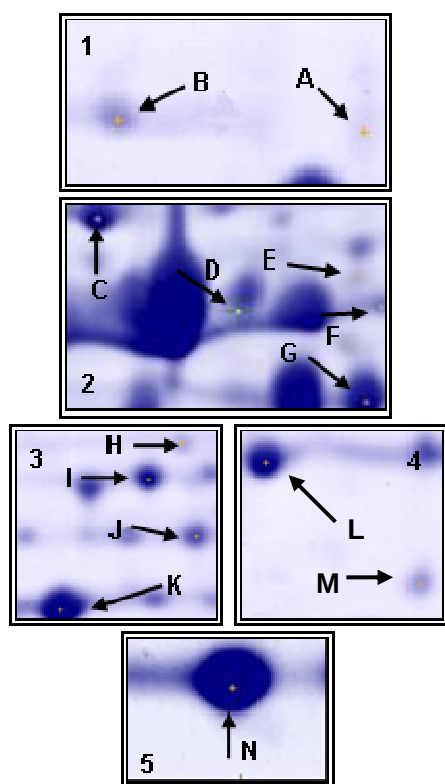
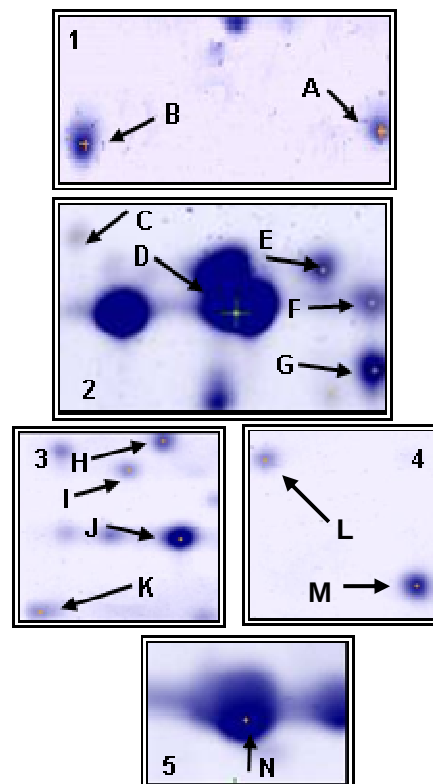
C. krusei em tratamento*C. Krusei* tratada com EtOH

Figura 18: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. krusei* após tratamento com extrato EtOH na concentração de 1000 µg/mL, visão ampliada das proteínas alteradas.

Tabela 15: Proteínas demonstradas na figura 18 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com Extrato bruto etanólico (EtOH) de *K. rubriflora*.

Spot	pI	MM (kDa)	Alteração na expressão
A	5,3	56,0	Aumento de 2,7 vezes com EtOH
B	4,8	54,7	Aumento de 2,3 vezes com EtOH
C	6,1	45,2	Diminuição de 6,6 vezes com EtOH
D	5,7	42,1	Aumento de 12,7 vezes com EtOH
E	5,7	41,2	Aumento de 3,0 vezes com EtOH
F	5,7	40,0	Aumento de 11,3 vezes com EtOH
G	5,7	38,1	Diminuição de 5,2 vezes com EtOH
H	5,4	35,5	Aumento de 3,0 vezes com EtOH
I	5,5	34,0	Diminuição de 2,0 vezes com EtOH
J	5,4	32,0	Aumento de 3,6 vezes com EtOH
K	5,6	29,2	Diminuição de 4,0 vezes com EtOH
L	6,15	26,4	Diminuição de 3,0 vezes com EtOH
M	5,3	26,5	Aumento de 2,8 vezes com EtOH
N	5,8	24,0	Aumento de 4,6 vezes com EtOH

Tabela 16: Proteínas não expressas após tratamento com o Extrato bruto etanólico de *K. rubriflora*.

NºSpot	pl	MM	NºSpot	MM	pl
21	96,0	4,60	158	42,7	6,4
22	90,8	6,0	162	42,1	5,5
28	89,3	5,9	166	41,0	5,8
32		6,0	167	41,7	5,4
33		5,8	176	40,7	5,4
43	79,0	5,4	184	40,2	5,6
44		5,3	187		5,5
45		5,2	195	38,0	5,8
48	77,3	4,4	199	38,2	5,7
49	76,5	4,7	223	35,2	6,2
50	75,2	6,7	227	34,3	6,2
51		5,5	228		5,4
53	74,4	5,6	257	29,6	5,5
54	73,6	5,0	265	28,4	5,6
64	69,2	6,1	270	27,6	6,5
65	69,6	6,0	272	27,3	7,1
72	64,4	5,5	278	26,7	5,8
73		5,5	288	23,1	5,5
75	62,2	4,9	289	21,8	5,6
79	63,4	5,9	298	19,4	5,6
82	60,3	6,0	300	19,3	5,8
90	56,7	5,7	301		5,6
91		5,5	307	17,8	5,9
97	54,7	4,8	309	17,2	5,0
102	51,6	4,8	310	16,9	6,0
135	45,2	6,1	312	17,0	5,7
141	44,5	6,4	315	15,7	5,8
142	44,0	5,0	316		4,9
143	43,6	5,0	317	15,6	6,3
144	44,1	4,9	319	15,5	5,9
147	43,6	5,4	320		5,6
149		5,5	323	14,8	7,5
152		5,7	329	14,2	5,8

A tabela 16 apresenta as proteínas não expressas de *C. krusei* após tratamento com o extrato etanólico. Verificou-se que 66 proteínas, variando seu pl entre 4,3 e 7,4 e massa molecular entre 96,0 e 14,1 kDa, não foram expressas após o tratamento com o extrato de *K. rubriflora*.

6. DISCUSSAO:

As leveduras estão entre os principais microrganismos causadores de um amplo leque de infecções, que vão desde as que não comprometem a vida dos pacientes como as infecções cutâneas e mucocutâneas até processos invasivos que podem envolver qualquer órgão. Embora *Candida albicans* continue a ser o patógeno mais comum, espécies não-*albicans* são cada vez mais freqüentes (SOBEL et al., 1997; PFALLER et al., 1998; GONÇALVES et al., 2006). Apesar da susceptibilidade das espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis ser prevista para as espécies conhecidas, alguns isolados, não necessariamente seguem o padrão (MARTINEZ-SUAREZ e RODRIGUEZ-TUDELA, 1995; NGUYEN et al., 1998; REX et al., 1998). Assim, tem-se observado aumento nos casos de resistência aos medicamentos por vários fungos patogênicos humanos (HOF, 2008). O pequeno número de classes de antifúngicos disponíveis tem estimulado a investigação de novas drogas de outras fontes, tais como de produtos naturais. A crise econômica, o elevado custo dos medicamentos industrializados, o acesso público ineficiente aos cuidados médicos e farmacêuticos, além dos efeitos colaterais causados pelas drogas sintéticas são alguns dos aspectos que contribuem para o uso das plantas medicinais no cuidado a saúde (HOLETZ et al., 2002; ROJAS et al., 2006; ABAD et al., 2007).

Apesar da grande biodiversidade do Cerrado e Mata Atlântica no Brasil, o potencial de espécies vegetais como fontes de novos medicamentos permanece inexplorado. Menos de 20% de todas as espécies vegetais a partir deste ambiente foram estudadas para a presença de substâncias biologicamente ativas. Nos últimos anos, as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas são cada vez mais notificadas em diferentes partes do mundo. Os extratos vegetais têm potencial para atuarem em diferentes alvos diferindo daqueles utilizados pelos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis, podendo apresentar atividade contra os microrganismos resistentes às drogas sintéticas (JOHANN et al., 2007).

Existem poucos exemplos da descoberta de substâncias bioativas da biodiversidade brasileira que têm servido como protótipos para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos e produtos farmacêuticos no Brasil. Além disso, muitas das

substâncias ativas, presentes nos extratos de plantas nativas do Brasil, ainda não foram identificadas havendo uma necessidade de maior desenvolvimento nesse campo (MOREIRA et al. 2006). Como exemplo de produtos comerciais derivados de plantas brasileiras pode-se mencionar Lerobina[®], que é utilizado no tratamento da indigestão (BOTION et al. 2005), e o antiinflamatório fitoterápico Acheflan[®] (GIORGETTI et al. 2007). Nos últimos anos, a interação entre universidades e empresas públicas principalmente no Brasil, bem como a legislação sobre patentes brasileiras foram insuficientes para a transformação dos resultados das investigações no sentido de desenvolver produtos e patentes (MOREIRA et al. 2006, GIORGETTI et al. 2007). Porém, este quadro está se alterando, e atualmente há um grande interesse no desenvolvimento destes produtos.

A atividade antifúngica de extratos e de compostos extraídos de plantas pode ser detectada por vários métodos, entretanto eles não são igualmente sensíveis. A metodologia para a determinação da atividade antifúngica em compostos naturais é variável e cada grupo de pesquisa tem empregado diferentes tipos de testes. Os mais utilizados são bioautografia (COZ et al., 2006), disco difusão (BARTNER et al., 1994), difusão em ágar (PASSOS et al., 2002; SOUZA et al., 2003; CORDELL e COLVARD, 2005) e diluição em meio líquido. Atualmente, o método de diluição em meio líquido é recomendado para ensaio com drogas antifúngicas para leveduras (M27-A2 do CLSI) e para fungos filamentosos (M38-A do CLSI).

Técnicas de diluição seriada foram recomendadas para determinação da atividade antifúngica de produtos naturais (PAULI e KUBECZKA, 1996; HADACEK e GREGER, 2000). Inicialmente, em nosso laboratório, a avaliação da atividade antifúngica dos extratos e frações obtidas de plantas foi realizada pela técnica de difusão em ágar, entretanto, este método não foi suficientemente sensível. Comparando os resultados com ambas as metodologias, observou-se que o método de difusão em ágar foi menos sensível do que o de microdiluição, além disso, esse último pode ainda determinar os valores de CIM, informações importantes para a investigação e produção de novos antifúngicos (SCORZONI et al., 2007-a; SCORZONI et al., 2007-b).

Na busca de novas fontes de substâncias antifúngicas, assim como o entendimento de seu mecanismo de ação, nosso grupo tem estudado atividade antifúngica de espécies de plantas originárias do Cerrado e Mata Atlântica do Brasil. Dentre os extratos, frações, e substâncias estudadas, 60%, 63,6% e 80,6% dos extratos brutos, frações e substâncias puras, respectivamente apresentaram atividade contra *C. albicans*. A melhor atividade encontrada, ou seja, valores menores que 75 µg/mL foram encontrados na família Clusiaceae. Em relação a *C. krusei*, 84%, 81,6% e 92,2% dos extratos brutos, frações e substâncias puras mostraram-se ativas, respectivamente. A família que mais se destacou com extratos brutos ativos foi Clusiaceae, e a família Rubiaceae apresentou os mais baixos CIM de frações cromatográficas.

A família Clusiaceae vem despertando grande interesse na comunidade científica, devido aos promissores resultados químicos e biológicos. Esta família é composta de 25 gêneros que se distribuem nas regiões tropicais do globo, sendo algumas espécies de ocorrência predominante no Brasil principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado. Muitas destas espécies são empregadas na medicina popular para tratar injúrias como dor, processos infecciosos, inflamatórios e úlceras (DHARMARATNE et al., 1999). Do ponto de vista químico, as espécies dessa família são reconhecidas como fontes de xantonas, benzofenonas, terpenos, esteróides, cumarinas e biflavonóides quanto às atividades biológicas, destacando-se as propriedades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicas, inibitória da promoção de tumor, inibitória da replicação do vírus HIV-1. Ensaios farmacológicos com xantonas naturais mostraram diferentes atividades, como antiinflamatória, antileucêmica, antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, antiviral (herpes), estimulante do miocárdio e do sistema nervoso central, hipertensora, antimicrobiana com atividade sobre fungos e bactérias, analgésica, e imunossupressora, o que evidencia o potencial desses metabólitos especiais como agentes medicinais (CRINCHTON et al., 1984; BENNET et al., 1989; NOLDIN et al., 2006).

Kielmeyera spp, pertencente à família Clusiaceae, é planta tipicamente encontrada no Cerrado brasileiro. A decocção dos caules de *K. coriacea* é tradicionalmente usada no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo

esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções bacterianas e fúngicas (ALVES *et al.*, 2000). Um extrato hidro-etanólico das folhas de *Kielmeyera coriacea* quando administrado cronicamente por sonda, exibiram um notável efeito ansiolítico em ratos (AUDI *et al.*, 2002). Xantonas e triterpenos foram isolados a partir desta planta, e exibiram atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e *C. albicans* (CORTEZ *et al.*, 1998). As xantonas derivadas de *Kielmeyera variabilis*, planta tradicionalmente utilizada na medicina popular brasileira, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (PINHEIRO *et al.*, 2003).

Dentre as plantas analisadas, dois extratos brutos (acetato de etila e etanólico) da planta *Kielmeyera rubriflora* foram selecionados por apresentarem acentuada atividade antifúngica. *K. rubriflora* conhecida popularmente por rosa-do-campo ou rosa-do-cerrado, ocorre nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo (LORENZI, 1998). Embora estudos indicaram que um extrato bruto dessa planta apresentou forte atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermu* quando avaliada por bioautografia, não existem relatos na literatura de seu uso contra leveduras potencialmente patogênicas (MONTEIRO *et al.*, 1996). Ambos os extratos selecionados apresentaram valores de CIM inferiores a 75,0 µg/mL, tanto para *C. albicans* como para *C. krusei*, sendo assim, a atividade antifúngica foi considerada forte (SCORZONI *et al.*, 2007). Os valores de CFM variaram de 250 a 62,5 µg/mL para *C. albicans* e 125 a 62,5 µg/mL para *C. krusei*. Nosso interesse voltou-se para esta espécie pelo fato de termos encontrado poucos relatos, na literatura, sobre o estudo desta planta (GOTTLIEB, *et al.*, 1971; MONTEIRO *et al.*, 1996).

Na seqüência deste estudo procurou-se verificar quais proteínas estariam envolvidas na resposta destas leveduras aos extratos de *K. rubriflora* e a droga fluconazol, empregada como controle. Existe uma crescente necessidade de se obter drogas efetivas contra novos alvos. As proteínas são os principais alvos na descoberta de novas drogas, com isso, identificar um alvo protéico essencial à célula é um desafio importante e as tecnologias proteômicas são fundamentais nesse campo. Apesar da complexidade das estruturas e funções das proteínas, as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia tem investido enorme quantidade de

recursos para decifrar e utilizar os dados proteômicos no desenvolvimento de drogas mais eficazes e bem sucedidas (WALGREN et al., 2004; KOPEC et al., 2005; GOMASE et al., 2008).

Infecções causadas por *C. krusei* têm aumentado nos últimos anos como consequência da sua resistência intrínseca aos azóis. Um dos principais mecanismos de resistência ao fluconazol em *C. krusei* é a diminuição da afinidade e encaixe das enzimas do citocromo P450, entre elas a esterol 14 α -desmetilase (CYP51) (FUKUOKA et al, 2003; GUINEA et al., 2006). Um mecanismo alternativo de resistência é atividade da bomba de efluxo, expressa por uma superfamília de transportadores ABC ou ATPases de transporte. Esta é a maior e mais diversificada das famílias de proteínas, envolvidas no transporte de substâncias através das membranas biológicas. As proteínas membros desta superfamília transportam uma variedade de substratos através da membrana celular, os quais incluem açúcares, aminoácidos, peptídeos, proteínas, metais, íons inorgânicos, toxinas e antibióticos (CROOP et al., 1998).

A análise proteômica tem auxiliado no entendimento dos fenômenos de resistência às drogas antifúngicas. Com o objetivo de detectar alterações protéicas durante o desenvolvimento da resistência, a análise proteômica de cepas sensíveis e resistentes de *C. albicans* ao fluconazol, revelou que proteínas envolvidas na síntese do ergosterol estavam alteradas (HOOSHDARAN et al., 2004). Em trabalho subsequente, Yan et al., 2007 verificaram que de 22 diferentes proteínas, a maioria era relacionada com o metabolismo de energia (Pgk1, Fba1, and Adh1), e algumas estavam relacionadas a resistência de *C. albicans* a fluconazol (Ald5, Cdc19 e Gap1). Por outro lado, *C. glabrata*, uma levedura emergente causadora de infecções fúngicas é intrinsecamente resistente aos triazóis, no entanto, os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade reduzida ainda não são compreendidos. A exposição dessa levedura ao fluconazol induziu a expressão de duas proteínas, uma de 169-kDa e outra de 61-kDa, identificadas respectivamente, como responsáveis pela bomba de efluxo e correspondente a lanosterol 14- α -demetilase, enzima responsável pela biossíntese do ergosterol. A rápida indução de proteínas envolvidas

na bomba de efluxo e a super expressão de lanosterol 14- α -demetilase são as responsáveis pela resistência intrínseca ao fluconazol (NIIMI et al., 2002).

A candidíase normalmente é tratada com derivados azólicos. No entanto, pode haver falha no tratamento devido ao aparecimento de resistência. As equinocandinas são uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas e sendo ativa contra isolados de *Candida* resistentes aos azóis. Os azóis inibem a 14- α -demetilase, enzima chave na síntese do ergosterol. Em contrapartida, a classe das equinocandinas inibe a síntese da β -(1,3)-D-glucana. A análise proteômica de *C. albicans* tratada com drogas azólicas e com derivados de equinocandina revelou alterações na expressão protéica. Este estudo mostra que antifúngicos com mecanismo de ação comum podem causar efeitos comparáveis em proteínas, assim como as drogas com diferentes mecanismos de ação provocam alterações proteômicas diferentes, dessa forma, a análise proteômica pode ser utilizada para distinguir diferentes antifúngicos, com a promessa de se tornar uma ferramenta útil para estudo de drogas através da triagem de proteínas alvos envolvidas em mecanismos de ação desconhecidos (BRUNEAU et al., 2003).

Visando um melhor entendimento da ação dos extratos na célula fúngica desenvolveu-se ensaios onde se realizou o contato dos extratos brutos AcOEt e EtOH de *Kielmeyera rubriflora* e da droga comercial fluconazol com as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*. Posteriormente foi realizada a análise protéica por eletroforese bidimensional.

O contato de *C. albicans* com fluconazol revelou modificações na expressão de nove proteínas, que variaram seus pls de 5,6 a 6,7 e a massa molecular de 59,0 a 17,4 kDa. Por outro lado, o tratamento com os extratos da planta influenciou na expressão de 10 e 11 proteínas, respectivamente. O extrato AcOEt alterou a expressão de proteínas na faixa de pls de 5,7 a 5,2 e nas massas moleculares de 90,5 a 18,8, enquanto que o etanólico, nos pls de 5,8 a 7,4 e com massas moleculares de 89,2 a 16,3. Os extratos de plantas causaram modificações nas leveduras diminuindo ou aumentando a expressão de proteínas. Estas modificações foram mais significativas que as causadas pelo fluconazol.

Nos ensaios de *C. krusei* com a droga comercial fluconazol, houve modificações na expressão de onze proteínas, as quais variaram seus pIs de 5,90 a 6,03 e as massas moleculares de 90,0 a 17,0 kDa. O tratamento com o extrato AcOEt influenciou na expressão de 16 proteínas com pIs entre 5,03 e 7,10 e massas moleculares variando entre 79,0 e 16,9 kDa, além disso, ocorreram alterações significativas, em que 44 proteínas não foram expressas com esse tratamento. O extrato EtOH influenciou a expressão de 14 proteínas na faixa de pIs de 4,7 a 6,1 e de massas moleculares de 56,5 a 23,8. Neste caso, interessante também não houve expressão de 66 proteínas, sugerindo um suposto bloqueio de uma ou mais vias, podendo existir vários alvos potenciais a serem caracterizados. Maiores informações poderão ser adicionadas após o seqüenciamento das proteínas não expressas após o contato com o extrato vegetal. Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

7. CONCLUSÕES

- O método M27- A2 do CLSI com modificações adaptado para determinação da concentração inibitória mínima de extratos vegetais foi adequado e apresentou reprodutibilidade.
- O método para determinação do CFM foi adequado para avaliar a ação dos extratos e substâncias vegetais.
- A eletroforese bidimensional é uma metodologia útil e sensível para a caracterização das proteínas envolvidas em ensaios de triagem de alvos para drogas vegetais.
- O extrato AcOEt da planta *Kielmeyera rubriflora* apresentou atividade antifúngica e teve ação fungicida em concentração de 250 µg/mL para *C. albicans* e 31,2 µg/mL para *C. krusei*.
- O extrato EtOH da planta *Kielmeyera rubriflora* apresentou atividade antifúngica e teve ação fungicida em concentração de 62,5 µg/mL para *C. albicans* e *C. krusei*.
- Várias proteínas foram alteradas em sua expressão quando *C. albicans* e *C. krusei* foram tratadas com ambos os extratos de *K. rubriflora*, bem como com fluconazol.
- Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para inibição da expressão protéica de *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos.

8. REFERÊNCIAS:

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc.**, v. 7, p.116-145 2007.

AEBERSOLD, R. H.; LEAVITT, J.; SAAVEDRA, R. A.; HOOD, L. E.; KENT, S. B. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 6970–6974, 1987.

AEBERSOLD, R. H.; PIPES, G.; HOOD, L. E.; KENT, S. B. N-terminal and internal sequence determination of microgram amounts of proteins separated by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, p.520-530, 1988.

AEBERSOLD, R. H.; TELOW, D. B.; HOOD, L. E.; KENT, S. B. Electrophoretic transfer onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p.4229-4238, 1986.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMANIA, J. R. A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 95, p. 367-373, 2000.

ANDERSEN, J. S.; MANN, M. Functional genomics by mass spectrometry. **FEBS Lett.**, v. 480, p.25-31, 2000.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**. v. 17, p. 443–453, 1996.

ANDES, D.; M. VAN OGTHROP. In vivo characterization of the pharmacodynamics of flucytosine in a neutropenic murine disseminated candidiasis model. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p.938-942, 2000.

ASIF, A. R.; OELLERICH, M.; AMSTRONG, V. W.; RIEMENSCHNEIDER, B.; MONOD, M.; REICHARD, U. Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. **J Proteome. Res.**, v. 5, p. 954-962, 2006.

AUDI, E. A.; OTOBONE, F.; MARTINS, J. V. C. AND CORTES, D. A. G. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on central nervous system. **Fitoterapia.**, 73, 517-519, 2002.

BAEZA, L. C.; REZENDE, J. F.; SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Epidemiologia das dermatofitoses em instituições públicas de Araraquara-SP. **Rev. Cien. Farmac.**, v. 25, p. 119-124, 2004.

BARRETT, D. From natural products to clinically useful antifungals. **Biochim Biophys Acta.**, v.1587, p. 224-233, 2002.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO A. G.; JUNIOR W. F. A.; MOREIRA I. S.; PALMA M. S.; CALIXTO J. B.; FILHO S. A.; SANTOS R. R.; SOARES M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v.100, p. 475-506, 2005.

BARTNER, A.; PFEIFFER, K.P.; BATNER, H. Applicability of disc diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. **Pharmazie.**, v. 49, p. 512-516, 1994.

BECK-SAGUÉ, C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **J Infect Dis.**, v.167, p. 1247-1251,1993.

BENNET, G. J.; LEE, H. H. Xanthonenes from Guttiferae. **Phytochemistry.**, v.28, p.967-998,1989.

BENNETT, J. E. Flucytosine. **Ann. Intern. Med.**, v.86, p.319-322, 1977.

BLUMBERG, H. M.; JARVIS, W. R.; SOUCIE, J. M.; EDWARDS, J. E.; PATTERSON, J. E.; PFALLER, M. A. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. **Clin Infect Dis.**, v.33, p.177-186, 2001.

BOTION, L. M.; FERREIRA, A. V. M.; CÔRTEZ, S. F.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. **J. Ethnopharmacol.**, v.102, p.137-142. 2005.

BOUAMAMA, H.; NOËL, T.; VILLARD, J.; BENHARREF, A.; JANA, M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. **J Ethnopharmacol.**, v.104, p.104-107, 2006.

BRUNEAU, J. M.; MAILLET, I.; TAGAT, E.; LEGRAND, R.; SUPATTO, F.; FUDALI, C.; CAER, J. P.; LABAS, V.; LECAQUE, D.; HODGSON. Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: comparison of the effect of beta(1,3) glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole. **J. Proteomics.** v. 3, p. 325-336, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUWA, L. V.; VAN STADEN, J. Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases in South Africa. **J. Ethnopharmacol.**, v.103, p.139-142, 2006.

CALDELARI, I.; LOELIGER, B.; LANGEN, H.; GLAUSER, M. P.; MOREILLON, P. Deregulation of the arginine deiminase (arc) operon in penicillin-tolerant mutants of

Streptococcus gordonii. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 2802-2810, 2000.

CAREY, A. J.; SAIMAN, L.; POLIN, R. A. Hospital-acquired infections in the NICU: epidemiology for the new millennium. **Clin Perinatol.**, v. 35, p.223-249, 2008.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Med J Aust.**, v. 187, p. 404-409, 2007.

CLSI **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos** Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. p. 1-29. (CLSI Documento M38-A. v. 22, n. 16)

CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras:** Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. p. 1-51. (CLSI Documento M27-A2. v. 22, n. 15)

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.28, p.570-576, 2007.

COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, p.113-118, 2000.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 5-14, 2005.

CORTEZ, D. A. G.; YOUNG, M. C. M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, L.; HOSTETTMANN, K. Xanthones, Triterpenes and a Biphenyl from *Kielmeyera coriacea*, **Phytochem.**, v. 47, p.1367-1374,1998.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S. ; PINA-VAZ, C. ; MENDONÇA, D. ; GONÇALVES, RODRIGUES A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.5, p. 365-374, 2008.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **J. Ethnopharmacol.**, v. 106, p. 290-302, 2006.

CROOP, J.M. Evaluationary relationships among ABC transporters. **Methods in Enzimology.**, v.292, p. 101-116, 1998.

CRINCHTON, E. G.; ALVES de LIMA, R. Minor xanthonenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.23, p.1757-1759, 1984.

CRUCIANI, M.; SERPELLONI, G. Management of Candida infections in the adult intensive care unit. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 9, p.175-191, 2008.

CRUZ, M. C.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, A. M.; JR, DE MÉLO D. L.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. **J. Ethnopharmacol.**, Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses ,v.111, p. 409-412, 2007.

DE JESUS, J. B.; CUERVO, P.; JUNQUEIRA, M.; BRITTO, C.; SILVA-FILHO, F. C.; SABÓIA-VAHIA, L.; GONZÁLEZ, L.J.; BARBOSA DOMONT, G. Application of two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. **J. Mass. Spectrom.**, v.42, p.1463-1473, 2007

DHARMARATNE, H. R.; PERERA, D. S. C.; MARASINGHE, G. P. K.; JAMIE, J.; **Phytochemistry.**, v.51, p. 111, 1999.

EDMAN, P. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 22, p.475–483, 1949.

ESPINEL-INGROFF A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v.9, p.175-1791. 2008.

FERNANDES, P.B. Molecular recognition: identifying compounds and their targets. **J Cell. Biochem. Suppl.**, v.37, p.1-6, 2001.

FERREIRA, M. E.; COLOMBO, A. L.; PAULSEN, I.; REN, Q.; WORTMAN, J.; HUANG, J.; GOLDMAN, M.H.; GOLDMAN, G.H. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.**, v. 43, p. 313-319, 2005.

FUKUOKA, T.; JOHNSTON, D. A.; WINSLOW, C. A.; DE GROOT, M. J.; BURT, C, HITCHCOCK, C. A.; FILLER, S. G. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, v.47, p. 1213-1219, 2003.

GARBER G. An overview of fungal infections. **Drugs**, v. 61, p.1-12, 2001.

GONÇALVES, R. H.; MIRANDA, E. T.; ZAIA, J. E.; GIANNINI, M. J. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. **Mycopathologia**, v.162, p.83-89, 2006.

GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L. E NAGEM, T. J. **Phytochemistry**, v.10, p.2253, 1971

GIOGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - a study of historical sources from the 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p. 338-347, 2007.

GOLDMAN, G. H.; DA SILVA FERREIRA, M. E.; DOS REIS MARQUES E.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; GODOY MARTINEZ, P. C.; GOLDMAN, M. H.; COLOMBO, A. L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 50, p. 25-32, 2004.

GOMASE, V. S.; KALE, K. V.; TAGORE, S.; HATTURE, S. R. Proteomics: technologies for protein analysis. **Curr. Drug .Metab.**, v.9, p.213-220, 2008.

GOODWIN, S. D.; CLEARY, J. D.; WALAWANDER, C. A.; TAYLOR, J. W.; GRASELA, T. H JR. Pretreatment regimens for adverse events related to infusion of amphotericin B. **Clin Infect Dis.**, v.20, p.755-761,1995.

GUINEA, J.; SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M.; CUEVAS, O.; PELÁEZ, T.; BOUZA, E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. **Med Mycol.**, v. 44, p.575-578, 2006.

HAPCIOGLU, B.; YEGENOGLU, Y.; DISCI, R.; ERTURAN, Z.; KAYMAKCALAN, H. Epidemiology of superficial mycosis (tinea pedis, onychomycosis) in elementary school children in Istanbul, Turkey. **Coll. Antropol.**, v.30, p.119-124, 2006.

HOF, H. Developments in the epidemiolgy of invasive fungal infections - implications for the empiric and targeted antifungal therapy. **Mycoses**. v. 51 Supl 1, p. 1-6, 2008.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v.7, p.1027-1031, 2002.

HOOSHDARAN, M. Z.; BARKER, K. S.; HILLIARD, G. M.; KUSCH, H.; MORSCHHÄUSER, J.; ROGERS, P. D. Proteomic analysis of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. : **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.48, p. 2733-2735. 2004.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay of choice. **Phytochem. Anal**, v.11; p. 137-147, 2000.

HORSBURGH, C. R; KIRKPATRICK, C. H. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. **Am J Med.**, v.74, p.23-29, 1983.

HUGHES, M. V.; SMITH, S.; GARCIA-SANCHEZ, A.; SALES, J.; STEVENSON, K. Proteomic comparison of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis. **Microbiology**. v. 153, p. 196-205, 2007.

ISOBE, T.; OSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brasilian medicinal plant Pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v.122, p.291-4, 2002.

JOHANN, S. ; PIZZOLATTI, M. G. ; DONNICI, C. L. et al. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p.632-637, 2007.

KAUFFMAN, C. A. Endemic mycoses: blastomycosis, histoplasmosis, and sporotrichosis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v.20, p.645-62, 2006.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p.231–243, 1975.

KONTOYIANNIS, D. P; Lewis, R.E Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet.**, v.359, p.1135-44, 2002.

KOPEC, K. K.; BOZYCZKO-COYNE D.; WILLIAMS, M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. **Biochem. Pharmacol.** v. 69, p. 1133-1339, 2005.

KRCMERY, V.; KALAVSKY, E. Antifungal drug discovery, six new molecules patented after 10 years of feast: why do we need new patented drugs apart from new strategies? **Recent. Patents. Anti-Infect. Drug. Disc.**, v.2, p.182-187, 2007.

KUMAR, R; SIVAKUMAR, T; SUNDERAM, R. S; GUPTA, M; MAZUMDAR, U.K; GOMATHI, P; RAJESHWAR, Y; SARAVANAN, S; KUMAR, M. S; MURUGESH, K; KUMAR, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of Bauhinia racemosa stem bark. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.38, p.1015-1024, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARCHER, G. ; MOREL, C. ; TRONCHIN, G.; LANDREAU, A.; SERAPHIN, D.; RICHOMME, P.; BOUCHARA, J. P. Investigation of the antifungal activity of caledonixanthone e and other xanthones against *Aspergillus fumigatus*. **Planta Med.**, v.70, p.569-571, 2004.

LARSEN, R. A.; BAUER, M.; THOMAS A. M.; GRAYBILL J. R. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 48, p. 985–991, 2004.

LEE, K. H. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. **J. Biomed. Sci.**, v. 6, p.236-250, 1999.

LI, X. C.; JACOB, M. R.; ELSOHLY, H. N.; NAGLE, D. G.; SMILLIE, T. J.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Acetylenic acids inhibiting azole-resistant *Candida albicans* from *Pentagonia gigantifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p.1132–5, 2003.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. 2, 106, 1998.

LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v.42, p. 325-329, 2007.

MACIEL, A. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, JR.; VALDI, R. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Quím. Nova.**, v.25, p.429-438, 2002.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991–2000. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 311–20, 2004.

MARICHAL, P.; VANDEN BOSSCHE, H.; ODDS, F. C.; NOBELS, G.; WARNOCK, D. W.; TIMMERMAN, V.; VAN, B. C.; FAY, S.; MOSE-LARSEN, P. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.41, p.2229-2237, 1997.

MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Patterns of in vitro activity of itraconazole and imidazole antifungal agents against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from Spain. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 39, p.1512–1516, 1995.

MAXWELL, K. L.; FRAPPIER, L. Viral proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, p. 398-411, 2007.

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

MOREIRA, A. C. ; MÜLLER, A. C. A. ; PEREIRA, JR, N. ; ANTUNES, M. A. S. Harmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World. Patent. Inf.**, v. 28, p.34-42, 2006.

MONTEIRO, M.C.M.; SILVA. G. H.; CANDIDA V. S.; LOPES, M, N.; BOLZANI, V, S.; YOUNG, M. C.M. Estudo químico dos caules de *Kielmeyera rubriflora* (Clusiaceae). Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1996

MOTSEI, M. L.; LINDSEY, K. L.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A. K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **J. Ethnopharmacol.**, v.86, p. 235-241. 2003.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, PAULO C. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-62, 1988.

NGUYEN, M. H.; CLANCY, C. J.; YU, V. L.; et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with candida fungemia. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p.425–30,1998.

NIIMI, M.; NAGAI, Y.; NIIMI, K.; WADA, S.; CANNON, R. D.; UEHARA, Y.; MONK, B. C. Identification of two proteins induced by exposure of the pathogenic fungus *Candida glabrata* to fluconazole. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v. 782, p.245-52, 2002.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. F.; FILHO, V.C. Gênero *Calophyllum*: Importância química e farmacológica. **Quim. Nova**, v. 29, p. 549-554, 2006.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of of peptides. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 22, p. 475–483, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. v. 405, p.837-846, 2000.

PANDEY, A; LEWITTER, F. Nucleotide sequence databases: a gold mine for biologists. **Trends Biochem Sci.**, v.24, p.276-80, 1999.

PAULI, A.; KUBECZKA, K.H. Evaluation of inhibitory data of essential oil constituents obtained with different microbiological testing methods. In: FRANZ, C.; MATHE, A.; BUCHBAUER, G. (Ed). Essential oils: basic and applied research. Carol Stream: Allured Pub. Corp., p.33-36, 1996.

PAPPALARDO, M. C; MELHEM, M.S. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.**, v.45, p.299-305, 2003.

PASQUALOTTO, A. C.; NEDEL, W. L.; MACHADO, T. S.; SEVERO, L. C. Risk factors and outcome for nosocomial breakthrough candidaemia. **J. Infect.**, v. 52, p.216-222, 2006.

PASSOS, X. S.; SANTOS, SDA. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, ODE F.; PAULA TDE. F.; GARCIA A. C.; SILVA, MDO. R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 623-627, 2002.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; SENTRY PARTICIPANT GROUP. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A.; JONES, R.N.; MESSER, S. A.; EDMOND, M.B.; WENZEL, R.P.; SCOPE Participant Group. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.30, p.121–129, 1998.

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

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D. A. G.; VIDOTTI, G. J.. Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Quím. Nova**, v.26, p.157-160, 2003.

PITARCH, A.; ABIAN, J.; CARRASCAL, M.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. **Proteomics**, v. 4, p. 3084-3106, 2004.

PITARCH, A.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v. 787, p. 101-128, 2003

RANGEL-FRAUSTO, M. S.; WIBLIN, T.; BLUMBERG, H. M.; SAIMAN, L.; PATTERSON, J.; RINALDI, M.; PFALLER, M.; EDWARDS, J. E JR.; JARVIS, W.; DAWSON, J.; WENZEL, R. P.; KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, p.253-258,1999.

REX, J.H.; WALSH, T. J, SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; PAPPAS, P. G.; DISMUKES, W. E.; EDWARDS, J. E. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p. 662-678, 2000.

REX, J. H.; LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V. Susceptibility testing of current *Candida* bloodstream isolates from Mycoses Study Group (MSG) collaborative study: isolates of *C. krusei* are often resistant to both fluconazole and amphotericin B. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 981,1998.

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

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; BERENGUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SANCHEZ R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 40, p.1998-2003, 1996.

ROGERS, P. D.; VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D.; HILLIARD, G. M. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 434-438, 2006.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 6, p. 2, 2006.

RUPP, S. Proteomics on its way to study host-pathogen interaction in *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 330-335, 2004.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 1-8, 1988.

SALGUEIRO, L.R.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; PINA-VAZ, C.; CAVALEIRO, C.; RODRIGUES, A. G.; PALMEIRA, A.; TAVARES, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. **Planta Med.**, v. 70, p. 572-575, 2004.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 73-81, 2000.

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

SARTORI, M. R.; PRETTO, J. B.; CRUZ, A. B.; BRESCIANI, L. F.; YUNES, R. A; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; CECHINEL, V. F. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa*. **Pharmazie**, v. 58, p. 567-569, 2003.

SCHEELE, G. A. Two-dimensional electrophoresis in basic and clinical research, as exemplified by studies on the exocrine pancreas. **Clin. Chem.**, v. 28, p. 1056-1061, 1982.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 391-397, 2007a.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeast *Candida* spp and *Cryptocuccus* sp. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, p. 25-34, 2007b.

SEIPELT, J.; LIEBIG, H. D.; SOMMERGRUBER, W.; GERNER, C.; KUECHLER, E. 2^a proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 20084-20089, 2000.

SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int .J. Antimicrob. Agents.**, v.30, p.487-495, 2007

SIMONETTI, G.; SIMONETTI, N.; VILLA, A. Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole. **J. Chemother.**, v. 16, p.122-127, 2004.

SINGH, N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, p. 1–7, 2001.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p.1896–903, 1997.

SOUZA, L. K.; DE OLIVEIRA, C. M.; FERRI, P. H.; DE OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; DE SOUZA JUNIOR, A. H.; FERNANDES ODE, F.; SILVA Mdo, R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 98, p. 963-965, 2003.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. JR. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 244-251, 2006.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.

SWOBODA, S. M.; MERZ, W. G; LIPSETTA, P. A. Candidemia: the impact of antifungal prophylaxis in a surgical intensive care unit. **Surg. Infect.**, v. 4, p. 345-354, 2003.

TAN, H. H. Superficial fungal infections seen at the National Skin Centre, Singapore. **Nippon. Ishinkin. Gakkai. Zasshi.**, v. 46, p. 77-80, 2005.

TERRELL, C. L.; HUGHES, C. E. Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. **Mayo. Clin. Proc.**, v. 67, p.69-91, 1992.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 627–630, 2002.

UNWIN, R. D.; WHETTON, A. D. How will haematologists use proteomics?. **Blood Rev.**, v. 21, p. 315-326, 2007.

VERMITSKY, J. P.; EARHART, K. D.; SMITH, W. L.; HOMAYOUNI, R.; EDLIND, T. D.; ROGERS, P. D. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 704-722, 2006.

VISCOLI, C.; GIRMENIA, C.; MARINUS, A. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 1071–1079, 1999.

WALGREN, J. L.; THOMPSON D. C. Application of proteomic technologies in the drug development process. **Toxicol. Letters**, v.149, p.377–385, 2004.

WALSH, T. J.; LEE, J.W.; ROILIDES, E.; PIZZO, P. A. Recent progress and current problems in management of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. **Curr. Opin.Oncol.**, v. 4, p. 647-655, 1992.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090–1094, 1995.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein detection methods in proteomics research. **Biosci. Rep.**, v. 25, p.19-32, 2005.

WHITE, T. C.; KIEREN, A. M.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 11, p. 382-402, 1998.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 309-317, 2004.

YAN, L.; ZHANG, J. D.; CAO, Y. B.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. Proteomic analysis reveals a metabolism shift in a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain. **J. Proteome. Res.**, v.6, p. 2248-2256, 2007.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, V. F. Pharmaceuticals and phytotherapies: the need for development of the industry of phytopharmaceuticals and phytotherapies in Brazil. **Quím. Nova.**, v.24, p.147-152, 2001.

ZEPELIN BORG-VON, M.; KUNZ, L.; RÜCHEL, R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROSS, U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, p. 424-428, 2007.

ZUPANIC-KRMEK, D.; NEMET, D. Systemic fungal infections in immunocompromised patients. **Acta Med Croatica.**, v. 58, p. 251-261, 2004.