

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

PAULA CRISTINA ANIBAL

Biomédica

Estudo da composição química e ação inibitória
dos extratos obtidos de *Punica granatum* L.
(romã) sobre *Candida* spp.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção de grau de Doutora
em Biologia Buco-Dental, área de
Concentração em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Co-orientador (a): Profa. Dra. Mary Ann
Foglio

Piracicaba

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8^a. / 8099

An52e	<p>Anibal, Paula Cristina.</p> <p>Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de <i>Punica granatum</i> L. (romã) sobre <i>Candida</i> spp / Paula Cristina Anibal. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p style="text-align: center;">Orientadores: José Francisco Höfling, Mary Ann Foglio. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Leveduras. 2. Plantas. 3. Microscopia eletrônica. 4. Taninos. I. Höfling, José Francisco. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Study of chemical composition and inhibitory action of extracts from *Punica granatum* L. (pomegranate) against *Candida* spp

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Yeasts. 2. Plants. 3. Electron microscopy. 4. Tannins

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: José Francisco Höfling, Ana Laura Remedio Zeni Beretta, Cristiane Duque, Francisco Carlos Groppo, João Ernesto Carvalho

Data da Defesa: 25-08-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Agosto de 2010, considerou a candidata PAULA CRISTINA ANIBAL aprovada.



Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HOFLING



Profa. Dra. ANA LAURA REMÉDIO ZENI BERETTA



Profa. Dra. CRISTIANE DUQUE



Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO



Prof. Dr. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

*Dedico este trabalho à minha mãe Creusa,
por sempre me incentivar a trilhar
um caminho de conquistas, pelo seu amor
e apoio, prestados a todo momento.
E a meu orientador Prof. Dr. Höfling,
por mais uma vez conceder essa
grande oportunidade.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS e ao Grande Mestre Jesus, agradeço imensamente pela minha vida, pelas dificuldades superadas, pelas pessoas importantes que cruzaram meu caminho nesta jornada e pelas oportunidades de aprendizado e trabalho, grandes privilégios que podemos ter e desenvolver.

À minha querida e amada mãe Creusa e avó Luiza, por todo seu amor, sua dedicação e seu apoio, fundamentais em todos os momentos da minha vida, sejam eles de alegria ou de dificuldade, sempre me incentivando a não desistir de minhas conquistas.

À minhas irmãs, Lilian e Raquel, cunhado Alexandre e sobrinhos Ana e Leonardo, por todos os incentivos dispensados e por sempre acreditarem em mim.

A meu namorado, Dhiego, por ser parte da minha vida, me abrir novos olhares e valores, pelo seu amor e dedicação.

A meu pai Armando (*in memoriam*), sinto-nos em paz. Sei que está feliz por mim, onde quer que esteja.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, por abrir, novamente, as portas do conhecimento, sendo mais que um orientador, um Amigo e Mestre, me dando apoio e orientação todo tempo, os quais foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e minha formação.

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio, mais uma vez pela co-orientação, por estar sempre me ensinado nas minhas dificuldades, me acolhendo novamente, pela amizade e o carinho.

À Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner, pelos ensinamentos e esclarecimentos prestados durante esta importante fase.

Aos Profs. Drs. Marta Cristina Teixeira Duarte e Rodney Alexandre Rodrigues, pelo auxílio dispensado e orientação.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, por permitir o uso do microscópio eletrônico de transmissão no Núcleo de Apoio à Pesquisa, Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da ESALQ/USP.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Haiter Neto (Diretor), pela oportunidade concedida de aprimoramento profissional e desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP.

Aos membros da banca examinadora, Profs. Drs. Ana Laura Remedio Zeni Beretta, Cristiane Duque, Francisco Carlos Groppo e João Ernesto Carvalho, por aceitarem avaliar este trabalho, enriquecendo-o com conhecimento e experiência, e aos suplentes Profs. Drs. Marcelo Henrique Napimoga, Pedro Duarte Novaes e Priscilla de Laet Sant'Ana Mariano, por aceitarem este convite.

Aos amigos da Pós-Graduação (em ordem alfabética) Andressa Venturini, Erika Hart, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Italo Sarto Rodrigues, Iza Teixeira Alves Peixoto, Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Julianna Joanna de Carvalho Moraes, Natália Vizoto, Rafael Nóbrega Stipp, Regianne Umeko Kamiya e Sérgio Eduardo Braga da Cruz,

com quem convivi durante este tempo de aprendizado e trabalho, pelos momentos inesquecíveis, a amizade e a cooperação.

Às funcionárias Wilma, do laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP, Eliene, do departamento de Morfologia da FOP, e Ilza, do departamento de Fitoquímica do CPQBA, pelos esclarecimentos, auxílio e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, e, principalmente, pela amizade.

A todos os amigos do CPQBA/UNICAMP, pela acolhida, carinho, tempos dispensados para o desenvolvimento do meu trabalho e pelos momentos sempre agradáveis de convivência.

A todos meus amigos e aqueles a quem tenho imenso carinho, por muitas vezes ter que me ausentar e ainda assim ser compreendida, por se alegrarem comigo, me incentivarem nesta caminhada e serem partes da minha razão de viver.

A um anjinho, em especial, que não está mais neste Plano Físico, mas que sempre será amado, e que despertou em mim a vontade de seguir esse caminho.

E a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa de doutorado.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa, processo nº 08/53185-0.

A coisa mais bela que
o homem pode experimentar
é o mistério.
É essa a emoção fundamental
que está na raiz de
toda a ciência e de toda a arte.

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

A diversidade de produtos naturais, por muitos anos, inspirou pesquisadores para identificar novos produtos que podem ser, eventualmente, desenvolvidos para novas terapias. Extratos obtidos *Punica granatum* L. (romã) tem demonstrado diversas atividades, dentre elas, efeito antimicrobiano. Nas últimas duas décadas, infecções por leveduras do gênero *Candida* cresceram significativamente pelo mundo inteiro, em decorrência do uso prolongado de antifúngicos, ligado ao aumento da resistência a esses fármacos. Sendo assim, pesquisas por novos componentes com ação antifúngica, os quais podem estar presentes nos compostos da *P. granatum*, justificam este estudo. Os extratos obtidos de diferentes partes do fruto da *P. granatum* foram testados através da metodologia da concentração inibitória mínima (CIM) frente a dez espécies de *Candida* spp. e analisados por espectrometria de massas. Foi observado, também, se os extratos produziam efeitos na morfologia e estrutura das leveduras através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, respectivamente. Os resultados obtidos revelaram-se promissores, pois as cepas testadas foram sensíveis aos extratos, com CIM de 125µg/mL, causando danos em sua morfologia, como irregularidades em sua superfície e em sua parede celular, e a espectrometria de massas revelou compostos de reconhecida ação antimicrobiana, dentre eles, taninos. Esses dados indicam que os compostos da *Punica granatum* possuem ação antifúngica, sendo que as substâncias detectadas podem ser consideradas as principais responsáveis por essa atividade. Sendo assim, substâncias da *Punica granatum* apresentam capacidade antimicrobiana, sendo um campo promissor para descoberta de novos fitomedicamentos para o tratamento alternativo de doenças, abrindo caminhos para pesquisas que visem explorar de forma coerente essas substâncias, manipulando-as com segurança, eficácia e qualidade padronizados.

ABSTRACT

The diversity of natural products has inspired researchers for many years to identify novel products that could eventually be developed into therapeutics. The extracts obtained from *Punica granatum* L. (pomegranate) have demonstrated several activities as antimicrobial affects, among others. In the last couple decades infections by yeast genus *Candida* increased significantly worldwide, in consequence of abuse use of antifungal, associated with increase drug resistance. There researches for new compounds with antifungal action, which may be present at *P. granatum* justify this study. The extracts were obtained from different parts of *P. granatum* fruit and tested against ten strains of *Candida* spp., by minimal inhibitory concentration (MIC) methodology and analyzed by mass spectrometry. Also scan and transmission electron microscopy was employed to evaluate the extracts effects on the yeast's morphology and structures. The results obtained were promising, because the tested strains demonstrated sensibility towards the extracts, with MIC of 125µg/mL, causing damage to the morphology, as irregularities on its superfaces and cell wall. The mass spectrometry analysis showed compounds with known antimicrobial action, among them, tannins. The data indicated that compounds of *Punica granatum* have antifungal action and the detected substances can be considered to be involved with this activity. Therefore, *P. granatum* extracts presented antimicrobial capacity and is a promising source for the discovery of new therapeutic agents for alternative treatment, promoting scientist to continue studies on safety, efficiency and standard quality issues for *P. granatum*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	- Acquired Immunodeficiency Syndrome
BHI	- Brain Heart Infusion
CBS	- Centraal Bureau voor Schimmelcultures
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CFM	- Concentração Fungicida Mínima
CH₂Cl₂	- Diclorometano
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CPMA	- Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	- Dimetil sulfóxido
EtOH	- Etanol
H₂O	- Água
HIV	- Human Immunodeficiency Virus
LDL	- Lipoproteínas de Baixa Densidade
MET	- Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	- Microscópio Eletrônico de Varredura
PM	- Peso Molecular
SAP	- Secreted Aspartyl Proteinase
SDA	- Sabouraud Dextrose Ágar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Plantas Medicinais: <i>Punica granatum</i> .	5
2.2 Propriedades dos compostos fenólicos da <i>Punica granatum</i> .	8
2.3 Atividade antimicrobiana dos Extratos da <i>Punica granatum</i>	14
2.4 Leveduras do gênero <i>Candida</i> .	15
2.5 Infecções por <i>Candida</i> e sua prevalência.	18
2.6 Resistência aos antifúngicos.	23
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Plantas.	31
4.2 Preparo dos extratos.	31
4.3 Monitoramento dos extratos.	37
4.4 Diluição dos extratos.	37
4.5 Cepas de microrganismos.	38
4.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método da Microdiluição.	38
4.7 Diluição do antifúngico nistatina.	38
4.8 Teste da suscetibilidade.	39
4.9 Espectrometria de massas.	40
4.9.1 Análise.	40
4.9.2 Preparo da amostra.	41
4.9.3 Obtenção dos espectros de massas.	41
4.10 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão.	42
4.10.1 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura.	42
4.10.2 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica	

de Transmissão.	42
5 RESULTADOS	45
5.1 Atividade antifúngica dos extratos diclorometano, etanol e aquoso.	45
5.2 Cromatografia de camada delgada.	47
5.3 Atividade antifúngica dos extratos obtidos através do processo enzimático com a enzima xilanase e branco.	48
5.4 Atividade antifúngica dos extratos arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro.	50
5.5 Análise por Espectrometria de Massas das amostras arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro.	52
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.	60
5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão.	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	81
8 REFERÊNCIAS	83
ANEXO 1	111
ANEXO 2	112

1. INTRODUÇÃO

Recentes investigações científicas tem procurado por novos compostos com ação antifúngica em produtos naturais, sendo que muitas plantas já foram selecionadas pela sua atividade contra vários tipos de doença, baseado em estudos etnofarmacológicos (Vermani & Garg, 2002; Mese *et al.*, 2004). Diversas variedades de plantas tem atraído a atenção de pesquisadores, visando a sua aplicação na medicina.

A despeito dos avanços sucessivos do uso de fármacos no tratamento de doenças de diversas patologias, uma grande parte da população mundial ainda depende da medicina tradicional baseada na fitoterapia (Azaizeh *et al.*, 2003). O conhecimento sobre o uso medicinal das plantas e suas propriedades tem sido transmitido de geração para geração (Lev & Amar, 2000), sendo a etnobotânica uma área muito importante de estudo e conhecimento em todo o mundo. Esta ciência mostra uma relação saudável entre humanos e natureza, estabelece a possibilidade de encontrar novos usos para as plantas medicinais e pode ser usada para descobrir novos medicamentos derivados de plantas (Heinrich, 2000). Há vários métodos de preparação e aplicações para diferentes enfermidades das plantas medicinais, e podem ser preparadas na forma de decocção, em pó/farelo ou espremidas e homogeneizadas com água. As preparações e aplicações se baseiam no tipo de enfermidade tratada e no sítio da infecção, sendo que podem ser administradas por diferentes vias, como a oral, tópica e nasal. A aplicação oral é a via mais comumente utilizada (57,5%), seguida pela tópica (37,5%) ou nasal e outros tipos (5%) de aplicações (Singh & Singh, 2009).

Por séculos, a casca, folhas, flores e frutos da *Punica granatum* L. (*Punicaceae*), popularmente conhecida como romã, tem sido usados para tratar doenças (Gracious Ross *et al.*, 2001). A romã é uma importante árvore de regiões tropicais e subtropicais do mundo e seu valor é devido ao seu delicioso fruto comestível (Badizadegan & Khabbazian, 1977). A parte comestível do fruto, delimitada por uma membrana, o pericarpo, é chamada de arilo, com uma única semente envolvida por uma bolsa cheia de suco, sendo ingerida fresca e da qual podem ser produzidos xaropes ou geléias. Além do mais, essa árvore também é valiosa por suas propriedades farmacêuticas. A casca do fruto, o caule, a raiz e folhas são fontes de

produtos secundários, como taninos, tinturas e alcalóides (Lansky & Newman, 2007; Mirdeghan & Rahemi, 2007).

Estudos com extratos da *P. granatum* e seus compostos, tem mostrado efeitos antioxidante (Ricci *et al.*, 2006), antiinflamatório (Lansky & Newman, 2007), hepatoprotetor (Celik *et al.*, 2009), para o tratamento de doenças orais (Fenghun & Liu, 1997), de pele, entre outros (Hu, 1997). Foi também usada para tratar acidose, disenteria, infecções microbianas, diarreia, helmintoses, hemorragia e patologias respiratórias (Fuentes & Exposito, 1995).

A atividade antimicrobiana da *P. granatum* tem sido recentemente investigada (Vasconcelos *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006b), e pode estar presente em algumas toxinas metabólicas ou nos compostos antibióticos de amplo espectro contidos na casca (Voravuthikunchai *et al.*, 2004). Duraipandiyan *et al.* (2006) encontraram alta atividade da romã com o extrato metanólico contra as cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Braga *et al.* (2005) observaram que o extrato metanólico das frutas de *P. granatum* foi capaz de inibir não somente o crescimento de *Staphylococcus aureus* FRI722, mas também a produção de enterotoxinas. Höfling *et al.* (2010) encontraram atividade antifúngica dos extratos da romã contra várias espécies de *Candida* spp.

A levedura do gênero *Candida* é um patógeno oportunista e muitos fatores de virulência podem contribuir para sua invasão e patogenicidade, assim como sua habilidade para aderir aos tecidos, conversão da sua forma unicelular para filamentosa e expressão de enzimas extracelulares, como aspartil proteinase e fosfolipases (Calderone & Fonzi, 2001).

Embora *C. albicans* seja a principal espécie isolada de amostras clínicas em indivíduos aidéticos, sabe-se que outras espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* estão em alta prevalência nas infecções (Ruhnke, 2006). Recentemente, candidose ressurgiu com um elevado nível de mortalidade, em prevalência de 45% nos grupos de pacientes comprometidos (Wenzel & Gennings, 2005). Falha da ação dos antifúngicos utilizados em doenças causadas por espécies não-*albicans*, como *C. glabrata* e *C. krusei* é agora um desafio terapêutico. Sabe-se que infecções por *C. krusei* estão se tornando prevalentes devido ao aumento na população imunocomprometida,

principalmente com o HIV (Human Immunodeficiency Virus) (Seneviratne *et al.*, 2007), mas também sabe-se que o fenômeno da resistência de microrganismos a antimicrobianos é um fato a se considerar.

A resistência microbiana está relacionada à perda da suscetibilidade de um microrganismo a um agente antimicrobiano que pode ser visualizado através de um teste de suscetibilidade *in vitro*, no qual a concentração inibitória mínima é a mais baixa concentração da droga que impede o crescimento visível do microrganismo (Alves *et al.*, 1997; Marichal *et al.*, 1999). Diversos fármacos antifúngicos, como fluconazol, cetoconazol, nistatina, anfotericina B e 5-fluorocitosina, podem interferir com certos fatores de virulência (Ellepola & Samaranayake, 1998; Hazen *et al.*, 2000), porém cepas emergentes resistentes às drogas tem dificultado o tratamento antifúngico, impedindo, muitas vezes, o restabelecimento da saúde do paciente (Odds *et al.*, 2003).

Pesquisas que visem ampliar o conhecimento sobre o potencial antimicrobiano de plantas, particularmente de *Punica granatum*, ou de seus componentes farmacológicos, relacionando os efeitos de suas propriedades farmacêuticas com sua atividade antimicrobiana, poderão contribuir para a sua aceitação como medicamento alternativo ou ao conjunto do tratamento alopático.

Essas considerações serviram de base para os estudos levados a efeito nesse trabalho de Tese, visando avaliar o uso de extratos obtidos de diferentes partes do fruto da *Punica granatum* L. como agentes antimicrobianos, associados à pesquisa dos componentes com potencial bioativo presentes nessas estruturas, determinados por espectrometria de massas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais: *Punica granatum*

Com o crescente desenvolvimento de resistência aos fármacos e o aparecimento de efeitos indesejáveis pelos agentes antifúngicos, pesquisas por novos componentes antimicrobianos tem sido uma preocupação de muitos pesquisadores (Phongpaichit *et al.*, 2005). Na última década, o interesse por produtos naturais tem aumentado, com as plantas medicinais sendo fontes de compostos bioativos. Estes compostos tem sido isolados e submetidos a análises estruturais detalhadas, e seu modo de ação e alvo conhecidos. Muitas plantas usadas na medicina popular tem sido estudadas por suas atividades antimicrobianas, como fonte de novos compostos antifúngicos com poucos efeitos colaterais, com grande espectro de ação e baixo custo (Ishida *et al.*, 2006). A triagem de extratos antibacterianos de plantas representa um esforço contínuo para encontrar novos compostos com potencial para agir contra bactérias multi-resistentes (Suffredini *et al.*, 2004).

A descoberta de fármacos envolvendo a diversidade de produtos naturais, combinado com metodologias de drogas sintéticas e incluindo a manipulação de vias biossintéticas, proporciona uma solução para a comunidade científica voltada para a descoberta e desenvolvimento de fármacos (Newman & Cragg, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde, pelo menos 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da "medicina popular" para a solução de problemas de saúde, e 85% deste total utilizam plantas medicinais no tratamento das mais diversas doenças. Isto significa, segundo o órgão da ONU, que cerca de quatro bilhões de pessoas no mundo dependem de remédios a base de plantas medicinais (Garcia *et al.*, 1996).

O Ministério da Saúde do Brasil, através da Portaria nº 971 de 03/05/2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde onde se insere a fitoterapia (Brasil, 2006) e no município de João Pessoa foi aprovada a Lei Municipal 7.630 de 15/07/1994, para a implantação do Programa de Plantas Medicinais, gerenciado pela Secretaria Municipal de Saúde (Semanário Oficial, 1994). Agra *et al.* (2007, 2008) observaram que 483 espécies de plantas com propriedades ativas

são utilizadas na região Nordeste. Apesar do número expressivo de plantas medicinais em uso, para a maioria delas, ainda não foram desenvolvidos estudos científicos sobre os seus constituintes ativos (Santos *et al.*, 2009).

A romã, *Punica granatum* L., é conhecida há muito tempo por seu fruto comestível, sendo mencionada na Bíblia e no Alcorão, estando associada com fertilidade. É nativa da Pérsia e se disseminou pela Ásia, Norte da África e Europa Mediterrânea, incluindo a Turquia. As plantações de romã na Turquia cresceram rapidamente nos últimos anos, com uma produção excedendo 100.000 toneladas em 2007 (Ozgen *et al.*, 2008).

A romã é conhecida por ser umas das frutas mais saudáveis, por sua alta atividade antioxidante (Gil *et al.*, 2000; Aviram *et al.*, 2004; Seeram *et al.*, 2006; Aviram *et al.*, 2008) e alto conteúdo de compostos anticarcinogênicos (Kim *et al.*, 2002; Lansky *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2005; Adhami & Mukhtar, 2006; Malik & Mukhtar, 2006; Bell & Hawthorne, 2008). Recentes estudos estabeleceram que certos compostos do suco da romã reduziram significativamente a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), podendo também reduzir a pressão sangüínea e possuir efeito antiaterosclerótico (Aviram *et al.*, 2008). A medicina popular recomenda tanto a casca do caule como do fruto para tratar diversas doenças. A casca do caule é empregada como vermífugo, em especial para tênias. Do fruto, são utilizadas as cascas dessecadas ou frescas para o tratamento de diarréias, infecções de pele e mucosas e as sementes frescas, com seus envoltórios rosados e suculentos, para as afecções da boca e garganta (Matos, 1989; Lansky *et al.*, 1998).

Outros trabalhos demonstraram que a romã e seus derivados apresentaram efeito fotoquimiopreventivo contra danos causados por raios ultra-violeta na pele humana (Afaq *et al.*, 2009); a ingestão diária de uma alta concentração de lignanas (1,5mg) presentes no suco da romã pode reduzir o risco de câncer de mama pós-menopausa (Touillaud *et al.*, 2007); foi constatado, também, que flavonóides presentes no suco da romã preveniram a oxidação do LDL e também foram anti-artrogênico (Wang *et al.*, 2004). De acordo com os resultados obtidos por Celik *et al.* (2009), pessoas tratadas com infusão das flores e folhas da romã tiveram redução dos níveis das enzimas AST e ALT, e dos danos no fígado, demonstrando um efeito hepatoprotetor dessa planta.

Dentre os constituintes presentes no fruto da *Punica granatum* L. estão os alcalóides (peletierina, metilpeletierina, pseudopeletierina e isopeletierina), manita, vários fenóis, ácido elágico e ácido gálico. A casca do fruto da romã contém alcalóides e, aproximadamente, 20% de taninos, incluindo punicalina, punicalagina, granatinas A e B, galagildilactona, casuarinina, pedunculagina, telimagrandina I e corilagina, com ação antibiótica (Fetrow & Avila, 2000). É empregada popularmente no tratamento de dores de garganta, rouquidão e inflamação da boca. Do pericarpo, rico em taninos, foram isolados granatinas A e B, punicalagina e punicalina, sendo estes os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (Catão *et al.*, 2006). Foram isolados de *P. granatum*, dois novos ácidos elágicos ramnosídeos, ácido metilelágico-3-*O* ramnopiranosídeo 4-*O*-aL e ácido dimetilelágico 3,4'-*O* ramnopiranosídeo 4 -*O*-aL (El-Toumy & Rauwald, 2003).

O suco fresco da romã contém considerável quantia de sólidos solúveis totais, açúcares totais, açúcares reduzidos, antocianinas, fenólicos, ácido ascórbico e proteínas, sendo considerado como uma rica fonte de agentes antioxidantes (Gil *et al.*, 2000; Kulkarni & Aradhya, 2005). Cuccioloni *et al.* (2009) analisaram os compostos da romã cultivada em duas diferentes regiões ao nordeste do Irã. Ao quantificar os extratos dos arilos e da casca da romã, obtiveram ácidos gálico e elágico, catequina e epicatequina como principais compostos monoméricos. Catequina é o mais abundante polifenol monomérico dos compostos da romã, sendo sugerido como um potencial agente para a regulação de um grande número de processos fisio-patológicos, como a coagulação, envolvendo a atividade da trombina humana. O potencial de bioatividade da punicalagina, e outros elagitaninos, pode ser explicado por sua capacidade de se hidrolisar em ácido elágico e outros polifenóis menores *in vivo* e atravessar a membrana mitocondrial *in vitro* (Seeram *et al.*, 2004; Larrosa *et al.*, 2006).

A romã é uma rica fonte de compostos fenólicos, o qual inclui flavonóides e taninos hidrolisáveis (Afaq *et al.*, 2005a). Extratos de diferentes partes do fruto da romã como o suco (Aviram *et al.*, 2000), as sementes (Wang *et al.*, 2004) e a casca (Lansky & Newman, 2007), tem apresentado grande atividade antioxidante. Diversos estudos tem demonstrado que seu suco possui propriedades antiaterogênica (Aviram, 2002), anti-inflamatória e anti-câncer (Afaq *et al.*, 2005b; Malik *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007), devido às suas

propriedades antioxidantes (Soobrattee *et al.*, 2005). De acordo com Singh *et al.* (2002), as propriedades antioxidantes do extrato da romã podem ser encontrados na casca e nas sementes sendo que o extrato metanólico da casca da romã demonstrou elevada atividade antioxidante entre os extratos testados. Mirdehghan & Rahemi (2007) observaram que os níveis de compostos fenólicos totais eram mais altos na casca da romã do que nos arilos.

2.2 Propriedades dos Compostos Fenólicos da Punica granatum

Os compostos polifenólicos compreendem um grupo da classe de metabólitos secundários das plantas, que agem como antioxidantes (Manach *et al.*, 2005). Compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e são produzidos como uma resposta da planta aos danos causados por patógenos. Em baixas concentrações, eles protegem o alimento da deterioração oxidativa. Em altas concentrações, seu produto oxidativo pode interagir com proteínas, carboidratos e minerais (Karakaya, 2004). Seus benefícios estão, geralmente, ligados a duas propriedades: (i) inibição de certas enzimas, como xantina oxidase, aldose redutase, e (ii) atividade antioxidante (Cotelle, 2001). Polifenóis podem proteger outros componentes dos alimentos, como os carotenóides e vitamina C, enzimas digestivas e células epiteliais do intestino da oxidação dos radicais livres gerados no estômago (McDougall *et al.*, 2005). Constituem um dos mais numerosos e amplos grupos de substâncias no reino vegetal e podem abranger desde moléculas simples, como ácido fenólico, a compostos altamente polimerizados, como os taninos.

Os compostos fenólicos são biossintetizados por diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo metabólico bastante heterogêneo (Taiz & Ziger, 2004). Estes compostos são sintetizados pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do ácido malônico, que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima-A (Simões *et al.*, 2007).

Flavonóides compõem um dos mais numerosos grupos de compostos fenólicos encontrados em vegetais e frutos (Schinella *et al.*, 2002; Tepe *et al.*, 2005), sendo descritos como o mais abundante grupo polifenólico em dietas humanas (Jialal & Devaraj, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996; Bravo, 1998; Scalbert & Williamson, 2000). Alguns deles estão

envolvidos no processo de cura de doenças causadas por radicais livres (Czinner *et al.*, 2000). Muitos compostos da *Punica granatum*, como alcalóides, flavonóides, polifenólicos (como delphinidina, cianidina e pelargonidina) e taninos hidrolisáveis, como punicalina, pedunculagina, punicalagina, ácido gálico e ácido elágico (ésteres de glucose), possuem forte propriedade antioxidante e tem sido investigados (Du *et al.*, 1975; Tzulker *et al.*, 2007). Estudos de Bagri *et al.* (2009) demonstraram que o extrato aquoso de *P. granatum* é benéfico no controle de diabetes, anormalidades no formato de lipídeos e no estresse oxidativo promovido pela atividade das enzimas antioxidantes pancreáticas.

Os principais compostos fenólicos presentes no suco da romã podem ser classificados em quatro grupos. O primeiro grupo inclui as antocianinas. No segundo grupo estão presentes os taninos hidrolisáveis do tipo galagil, incluindo grupos de isômeros de punicalagina (B e D), punicalina (galagilglucose) e outros compostos relacionados. No terceiro grupo do suco da romã, os compostos fenólicos incluem o ácido elágico e seus glicosídeos. O quarto grupo é formado por um extenso grupo de taninos hidrolisáveis, no qual esses compostos são diferentes combinações de glucose, ácido gálico, ácido hexahidroxiidifênico e ácido tertagálico (Gil *et al.*, 2000).

As antocianidinas podem ser mais estáveis na forma de heterosídeos, chamadas antocianosídeos. Os antocianosídeos, após perda de açúcar por hidrólise ácida, são chamados antocianidina ou aglicona. A biossíntese das antocianinas representa um dos estágios finais de oxidação no mecanismo de diferenciação dos flavonóides (Lobo & Lourenço, 2007; Simões *et al.*, 2007). As antocianinas, pertencentes à família dos flavonóides biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis (Saviranta *et al.*, 2008). São compostos de biossíntese mista, envolvendo blocos provenientes da via do poliacetato e da via do chiquimato (Lobo & Lourenço, 2007). São responsáveis pelas cores azul, púrpura e vermelha de muitos tecidos de plantas (McGhie *et al.*, 2007), sendo capazes de serem absorvidas intactas, como os glicosídeos (Cao *et al.*, 2001).

As antocianinas previnem a oxidação de lipídeos presentes em diferentes ambientes, como o LDL, liposomas, e atividade de remoção de vários radicais livres (Vinson *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Duman *et al.* (2009) correlacionaram

que a grande quantidade de antocianinas presentes no suco da romã exerceram alta atividade antibacteriana e antifúngica nos testes realizados, devido à sua capacidade antioxidante. Esta classe de compostos demonstrou atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiaterosclerótica e propriedades anticâncer em diversos estudos (Kong *et al.*, 2003a; Zafra-Stone *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2007). A forma comum de aglicona, antocianidina, encontrada é cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, malvidina e pelargonidina. Todas elas tem em sua estrutura o cátion flavílio em baixo pH, e diferem entre si através de diferentes substituintes no anel B. Os açúcares prevalentes são glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose. Ambas as formas mono- e diglicosídeos são comuns. O grupamento funcional de açúcar pode ser localizado nos carbonos 3, 5, 7, 3' e 5' (Macheix *et al.*, 1990).

Schwartz *et al.* (2009) compararam frutos da romã, seus compostos e atividades, de duas regiões diferentes de Israel: Newe Ya'ar (clima Mediterrâneo) e Arava (clima desértico). Os frutos de Newe Ya'ar, cultivados em regiões de baixas temperaturas, apresentaram alto nível de antioxidantes e compostos fenólicos totais, comparado com os frutos de Arava, durante o período de maturação. A temperatura é um importante fator que afeta o acúmulo de antocianinas nas plantas, sendo que a temperatura relativamente fria de Newe Ya'ar parece promover um aumento da glicose e frutose, como mostrado em trabalhos com amendoim (Casini *et al.*, 2003) e batatas (Fauconnier *et al.*, 2002), e altas temperaturas excedendo 40°C (como na região de Arava) podem diminuir a quantidade de açúcar, como observado em uvas (Pereira *et al.*, 2006a).

Os resultados dos trabalhos de Schwartz *et al.* (2009) indicam que as antocianinas totais medidas na casca do fruto da região de Newe Ya'ar tinham níveis mais elevados, indicando que altas temperaturas da região de Arava reduzem a quantidade de antocianinas totais tanto da casca quanto dos arilos da romã. Porém, o níveis de punicalagina, o principal composto dos taninos hidrolisáveis encontrado na casca, e punicalina nos frutos de Arava eram mais elevados, aumentando com isso a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais desses frutos.

Análises químicas realizadas por Dudonné *et al.* (2009) mostraram que os compostos fenólicos da romã contêm elevados níveis de taninos hidrolisáveis, como punicalina, punicalagina, pedunculagina e punigluconina.

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (Simões *et al.*, 2007).

A importância das plantas ricas em taninos está ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro. Durante o curtimento são formadas ligações entre as fibras de colágeno na pele animal, a qual adquire resistência ao calor, água e abrasivos. Esta capacidade dos taninos em combinar-se com macromoléculas explica a capacidade deles precipitarem celulose, pectinas e proteínas. Essas propriedades são a base da definição clássica dos taninos: substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3.000 Daltons, que apresentam a habilidade de formar complexos solúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Estes compostos são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (Simões *et al.*, 2007), e podem agir como inibidores da transcriptase reversa e HIV (Kilkuskie *et al.*, 1992).

Segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato (Heldt, 1997), onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (Vickery & Vickery, 1981). Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (Bruneton, 1991).

Largamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol (Brandes & Freitas, 1992; Heldt, 1997; De Bruyne *et al.*, 1999a; Heil *et al.*, 2002a; Heil *et al.*, 2002b).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros tem identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas se podem citar: ação bactericida e fungicida (Scalbert, 1991; Chung *et al.*, 1998c), antiviral (Okuda *et al.*, 1993; De Bruyne *et al.*, 1999b), moluscida (Marston & Hostettmann, 1985), inibição de enzimas como glicosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (Hattori *et al.*, 1990; Ooshima *et al.*, 1993), inibição da peroxidação de lipídeos e seqüestrador de radicais livres (Hagerman *et al.*, 1998; Moure *et al.*, 2001) e ação antitumoral (Wang *et al.*, 1999; Dufresne & Farnworth, 2001).

Acredita-se que as atividades farmacológica dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), 2) atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e 3) habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente ligados a essas três propriedades (Haslam, 1996, 1998).

As aplicações das drogas com taninos estão relacionados, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e anti-séptico, por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo, assim, as camadas subjacentes (Bruneton, 1991). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações (Bruneton, 1991). Em processos de curas de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (Simões *et al.*, 2007).

Porém, os taninos são considerados nutricionalmente indesejáveis porque precipitam proteínas, inibem enzimas digestivas e afetam a utilização de vitaminas e minerais podendo, ainda, em alta concentração, desenvolver câncer de bochecha e esôfago (Chung *et al.*, 1998a; Chung *et al.*, 1998b; Castro *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2001). Chung *et al.* (1998a, b) relataram que nozes contendo cerca de 25% de taninos podem ser responsáveis pela alta incidência de câncer de esôfago em uma determinada localidade dos Estados Unidos, onde pessoas comumente as consomem após o almoço. Contraditoriamente, a atividade anticarcinogênica é evidenciada pelos mesmos autores, onde afirmam que os japoneses consomem o chá verde, rico em ácido tânico e outros polifenóis, em grandes quantidades e o risco de câncer gástrico mostra-se baixo. Diante desses dois trabalhos, pode-se dizer que o desenvolvimento ou não de câncer pode estar associado com a quantidade e concentração de taninos ingeridos, e determinar tanto o valor quanto o tipo de tanino que contribuem para que os benefícios nesses compostos possam ser melhores aproveitados.

Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em baixas concentrações (0,5g/L), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido (Castro *et al.*, 1999). Nishizawa *et al.* (1990) demonstraram significativa atividade bactericida do decocto da raiz de *Nuphar variegatum* Durand contra microrganismos patógenos. A análise cromatográfica (HPLC) do extrato aquoso da raiz desta planta evidenciou dois galotaninos e dois elagitaninos, sendo reconhecidos por nupharina A e nupharina B. Existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana. A primeira hipótese pressupõe a inibição das enzimas de bactéria e fungos e/ou a complexação dos substratos dessas enzimas; a segunda seria a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo. Finalmente, a terceira hipótese menciona a complexação dos taninos com íons metálicos (Mila *et al.*, 1996), diminuindo, assim, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos (Simões *et al.*, 2007).

Polifenóis são fitoquímicos hidrolisáveis e quanto mais hidrofílico é o solvente extrator, melhor esses compostos serão recuperados da planta (Negi & Jayaprakasha, 2003;

Alzoreky & Nakahara, 2003). O mecanismo responsável pela toxicidade do composto fenólico contra microrganismos pode estar na reação com os grupos de proteína sulfidril e substratos do microrganismo, interferindo com a secreção protéica bacteriana (Machado *et al.*, 2003; Naz *et al.*, 2007).

Segundo Howell (2002), antocianinas e proantocianidinas possuem propriedades antibacterianas, assim como habilidade de inibir a adesão bacteriana à mucosa do trato urinário. Duman *et al.* (2009) investigaram a atividade antimicrobiana de seis variedades de *Punica granatum*, correlacionando com suas propriedades fitonutrientes, dentre elas os compostos fenólicos totais e antocianinas, encontrando resultados positivos para a inibição dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e *Candida albicans* testados, relacionando com a capacidade antioxidante dessa planta. Kakiuchi *et al.* (1986) e Pereira *et al.* (2006b), demonstraram a ação antimicrobiana da *P. granatum* Linn no biofilme bacteriano dental, com perturbação da síntese de poliglicanos, agindo nos mecanismos de aderência dos organismos do biofilme à superfície dental.

2.3 Atividade Antimicrobiana dos Extratos da *Punica granatum*

Diversos trabalhos demonstram a atividade antimicrobiana do extrato da romã contra vários microrganismos, como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Erwinina carotovora*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Cryptococcus neoformans* e *Nocardia asteroides* (Diniz *et al.*, 1997; Nascimento *et al.*, 2000; Prashanth *et al.*, 2001; Holetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2002).

Naz e colaboradores (2007) testaram compostos isolados puros do suco da romã contra várias espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, encontrando efeito inibitório, demonstrando que o ácido gálico apresentou elevada atividade antibacteriana contra todas as cepas que foram sensíveis a essa fração.

Metais de baixa densidade molecular, como o cobre e o ferro exibem atividade antibacteriana (Ug & Ceylan, 2005). A adição de altas quantidades de vitamina C ao extrato

da casca do fruto da romã, quando adicionados dos íons cobre e ferro, aumentou consideravelmente sua atividade contra *S. aureus* (McCarrel *et al.*, 2008).

Trabalhando com o vírus da AIDS, Neurath *et al.* (2005) observaram que o suco da romã possui atividade contra o HIV, inibindo sua ligação com o linfócito CD4 e seus receptores (CXCR4/CCR5), impedindo, desse modo, o desencadeamento da infecção. Para pacientes portadores desse vírus, a descoberta do composto que impeça essa ligação tornaria o tratamento mais eficiente, aumentando as chances de uma vida mais saudável.

Quando analisado o extrato da romã na inibição de leveduras do gênero *Candida*, vários trabalhos mostram atividade dessa planta, como demonstrado por Navarro *et al.* (1996), Vasconcelos *et al.* (2003), Durairandiyan *et al.* (2006), Vasconcelos *et al.* (2006), Reddy *et al.* (2007), Al-Zoreky (2009) e Duman *et al.* (2009). Anibal (2007) avaliou a atividade da romã através dos extratos brutos diclorometano e metanólico, contra cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, e *C. rugosa*, demonstrando atividade antifúngica desta planta de interesse para a terapia alternativa contra esses microrganismos.

2.4 Leveduras do Gênero Candida

Células leveduriformes do gênero *Candida* tem sido estudadas com o objetivo de avaliar substâncias contra esses microrganismos. A estrutura da parede celular fúngica, a camada fibrilar, as membranas citoplasmáticas e vários componentes da célula fúngica são alvos seletivos para os agentes antifúngicos (Droucht & Dupont, 1987; Odds, 1988). Sua parede celular contém manoproteínas, com propriedades imunossupressoras que podem aumentar a persistência do fungo nas lesões (Nelson *et al.*, 1991), glucanos, quitina, proteínas e lipídios (Odds, 1985; Kennedy, 1988; Odds, 1988; Shepherd, 1991).

Para promover infecção, os fungos precisam aderir a tecidos específicos do hospedeiro, resistir aos seus mecanismos de defesa e proliferar por certa extensão. Sendo assim, os fungos usam várias estratégias para sobreviver no hospedeiro e desencadear doenças (Odds, 2000). Como resultado da falha da defesa do hospedeiro, o fungo ganha

acesso a diferentes órgãos internos e tecidos, causando doenças coletivas, denominadas de candidose (Berman & Sudbery, 2002).

Candida spp. são leveduras que normalmente se apresentam como células individuais e que se reproduzem assexuadamente por brotamento. *Candida albicans* é uma levedura diplóide polimórfica com oito pares de cromossomos. Pode se replicar em condições de anaerobiose, como ocorre no intestino (Kruppa, 2008). Quase 200 espécies de *Candida* são conhecidas, porém apenas algumas são importantes para o homem. As mais importantes são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (Bernhardt & Knoke, 1997; Calderone, 2002; Hube, 2004).

Arendrup *et al.* (2002) observaram notáveis diferenças entre oito espécies de *Candida*, e as agrupou em três grupos, em ordem decrescente de patogenicidade. O grupo mais patogênico compreende *C. albicans* e *C. tropicalis*, seguido por um grupo intermediário, composto por *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*, e no último grupo estão *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

Esses microrganismos são capazes de viver em saprofitismo nos diferentes sítios da boca, dependendo do pH, disponibilidade de nutrientes e superfícies da mucosa (Marsh & Bradsha, 1997). Fungos são freqüentemente isolados de diversos sítios orais, incluindo a língua, mucosa jugal, palato, biofilme dental, microbiota subgengival, lesões de cárie e aparelhos protéticos (Nikawa *et al.*, 2002). Estudos de Makihiro *et al.* (2002) e Nikawa *et al.* (2003), tem sugerido uma possível relação entre *C. albicans* e doenças periodontais, dentina e/ou cárie de raiz, que mostraram que esta levedura tem similar capacidade para colonizar a hidroxiapatita, assim como o *Streptococcus mutans*, porém usando diferentes mecanismos.

Diversos fatores, como adesão ao tecido do hospedeiro, características morfológicas, formação de tubo germinativo, percepção de contato, mudança fenotípica, sinergismo com bactérias, produção de hidrolases ou outros metabólitos, e produção de enzimas extracelulares foram propostos como fatores de virulência de *C. albicans* (Odds, 1988; Olsen 1990; Bendel, 2003). A adesão da levedura nas superfícies mucosas do hospedeiro é um pré-requisito para colonização e infecção (Olsen 1990; Bendel, 2003).

Superfícies mucosas do hospedeiro servem como reservatório para a disseminação de infecções, como infecção gastrointestinal, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Nikawa *et al.*, 2006). Durante os estágios iniciais da infecção superficial da mucosa, *C. albicans* forma hifas filamentosas (Sherwood *et al.*, 1992; Gow *et al.*, 1994), junto com a liberação de várias enzimas hidrolíticas (Ruechel, 1990). Uma das mais importantes enzimas hidrolíticas produzidas por *C. albicans* é a fosfolipase, a qual vem sendo classificada em vários subgrupos (Jayatilake *et al.*, 2005).

As fosfolipases, conhecidas por sua atividade citolítica, são encontradas em muitas toxinas bacterianas, em veneno de artrópodes e de cobras (Verheij & Dijkstra, 1994). São classificadas como fosfolipases-A, -B, -C e -D, lisofosfolipase e lisofosfolipase-transacilase (Ghannoum, 2000). São também conhecidas por participarem na quebra de fosfolipases da membrana celular do hospedeiro durante a invasão infecciosa (Hube & Naglik, 2002).

A levedura *C. albicans* utiliza, também, proteínas SAP (secreted aspartyl proteinase) como enzimas ativas para modificar proteínas-alvo ou ligações na superfície fúngica ou na célula do hospedeiro que permite alterar sua hidrofobicidade ou alterações conformacionais, permitindo melhor adesão do fungo (Monod & Borg-von Zepelin, 2002). As SAPs são codificadas por uma família de multigenes, reguladas por dez diferentes genes (SAP1 – SAP10). A existência de 10 genes e o controle de sua expressão e regulação aumenta o número de processos envolvidos nas funções dessas proteinases durante o processo de infecção (Hube *et al.*, 1991). A proteína SAP2, e possivelmente outras SAPs, é conhecida por degradar muitas proteínas humanas, incluindo mucinas, proteínas da matriz extracelular, inúmeras moléculas do sistema imune, proteínas celulares endoteliais e fatores de coagulação, incluindo moléculas que protegem a superfície mucosa, como mucinas (Colina *et al.*, 1996; De Repentigny *et al.*, 2000), imunoglobulinas A (Rüchel, 1986), queratina e colágeno (Ogrydziak, 1993; Hube, 1996).

Em condições laboratoriais, o principal gene de proteinase expressado por *C. albicans* na forma leveduriforme é SAP2, a qual, provavelmente, regula um mecanismo de *feedback* positivo: peptídeos resultantes da proteólise de proteínas de elevada massa molecular permitem a indução da expressão do gene de SAP2 (Hube *et al.*, 1994). Em

compensação, foi observado que SAP1 e SAP3, que contribuem para o desenvolvimento de danos nos tecidos mucosos (Korting *et al.*, 1999), são expressas diferenciadamente durante mudanças fenotípicas em certas cepas (Germaine & Tellefson, 1981; White, *et al.*, 1993). Porém, estudos indicam que a regulação de SAP3 durante essa mudança não é absoluta, e genes SAP4-6 foram quase exclusivamente expressos durante a formação das hifas em pH neutro (Hube *et al.*, 1994; White & Agabian, 1995).

A transição da forma de levedura para hifa – e vice-versa – é controlado por vários fatores, incluindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (Bastidas & Heitman, 2009; Noverr *et al.*, 2001; Noverr *et al.*, 2004; Noverr *et al.*, 2005; Carlisle *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2008), ou pelo contato com peptidoglicanos bacterianos (Xu *et al.*, 2008).

O termo “mudança fenotípica” significa a rápida mudança na estrutura da superfície da célula. Isso tem sido observado em algumas cepas de *Candida* e faz com que seja mais difícil para o sistema imune reconhecer essas células leveduriformes, podendo estar associado com a formação de biofilmes (Soll, 2002; Huang *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006; Ramirez-Zavala *et al.*, 2008).

A associação com a superfície celular estimula a formação de biofilmes (Kumamoto & Vines, 2005). Biofilmes são aglomerados tri-dimensionais de microrganismos, que aderem a uma superfície e são circundados por substâncias poliméricas extracelulares (Nobile & Mitchell, 2006; Kruppa, 2008). O biofilme protege a célula leveduriforme como um casulo, e impede o ataque de defesas do ambiente, como o sistema imune. Resistência aos antifúngicos é aumentada por mudanças nas reações metabólicas presentes no biofilme. Por exemplo, a redução da síntese de ergosterol da membrana celular faz com que a levedura seja menos sensível ao antifúngico num fator de 30 a 2000 vezes (Douglas, 2003).

2.5 Infecções por Candida e sua Prevalência

Nas últimas duas décadas, infecções fúngicas por leveduras cresceram significativamente pelo mundo inteiro (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, infecção por leveduras está classificada como a quarta causa mais comum de infecção

sangüínea nosocomial (Wisplinghoff *et al.*, 2004). No Brasil, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as espécies mais comuns isoladas de infecção sangüínea nosocomial em vários centros médicos (Colombo *et al.*, 2006; Medrano *et al.*, 2006; Passos *et al.*, 2007).

Trabalhos de Bruder-Nascimento *et al.* (2010) demonstraram que, de um total de 212 culturas de leveduras, 70 (33%) eram isolados de *C. albicans*; 66 (31,8%), *C. parapsilosis*; 38 (17,9%), *C. tropicalis*; 25 (11,8%), *C. glabrata*; 10 (4,7%), *C. guilliermondii*; 2 (0,9%), *C. lusitaniae*; e 1 (0,5%), *C. pelliculosa*. Com relação aos materiais clínicos, *C. parapsilosis* foi a espécie mais comumente isolada de infecção sangüínea e fluído peritoneal, enquanto *C. albicans* apresentou uma distribuição homogênea entre três fontes: infecção sangüínea, fluído peritoneal e trato urinário. *Candida tropicalis* e *C. glabrata* foram isoladas, principalmente, de infecções do trato urinário.

Um total de 7191 isolados clínicos de *Candida* foi obtido de um estudo envolvendo 81 centros médicos em 29 países entre janeiro de 2004 a dezembro de 2007 denominado ARTEMIS, um programa global de vigilância a antifúngicos (Pfaller *et al.*, 2002, 2004b, 2007a, 2007b). Esses isolados incluíam 3789 cepas de *C. albicans*, 1003 de *C. parapsilosis*, 1021 de *C. glabrata*, 847 de *C. tropicalis*, 240 de *C. krusei*, 79 de *C. guilliermondii*, 85 de *C. lusitaniae*, 57 de *C. kefyr*, 26 de *C. famata*, 14 de *C. pelliculosa*, 10 de *C. lipolytica*, 11 de *C. dubliniensis*, 5 de *C. rugosa*, e 1 de *C. intermedia*. Todos os isolados foram obtidos de sítios como sangue (65%), “tecidos” (10%), abscessos (9%), fluído peritoneal (6%), fluído articular (1%), fluído cerebrospinal (1%), cateter (1%) e outros (7%).

Espécies de *Candida* são prevalentes e importantes patógenos encontrados em pacientes hospitalizados e com infecções nosocomiais (Pfaller & Diekema, 2007), e a mortalidade permanece alta há 20 anos apesar do avanço da terapia antifúngica (Gudlaugsson *et al.*, 2003), podendo ocorrer resistência cruzada ao fluconazol e voriconazol entre os isolados clínicos (Pfaller *et al.*, 2002, 2004a, 2007b). Apesar da elevada freqüência da colonização de *Candida* comensal (superior a 75% da população), poucos indivíduos desenvolvem candidose oral. Essa doença pode ser classificada em quatro tipos clínicos distintos: candidose pseudomembranosa, candidose eritematosa crônica, candidose hiperplásica crônica e candidose eritematosa aguda (Cannon *et al.*,

1995). Espécies de *Candida* tem sido implicada na etiologia de outras doenças orais, incluindo carcinoma celular escamoso, queilite angular, síndrome da boca queimada e líquen plano (Krogh *et al.*, 1987; Gerson, 1990; Kurnatowska, 2001).

Trabalhos de Patel *et al.* (2006) demonstraram que de um total de 173 isolados de leveduras de pacientes HIV-positivos, 136 (78,6%) corresponderam à espécie *C. albicans*, enquanto que os outros 21,4% eram espécie não-*albicans*, sendo as mais isoladas *C. dubliniensis* (6,3%), *C. glabrata* (5,2%), *C. parapsilosis* (1,7%), *C. lusitaniae* (1,7%) e *Saccharomyces cerevisiae* (1,7%), e em menor quantidade, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. utilis*. De Repentigny *et al.* (2004) observaram que candidose orofaríngea é a mais comum infecção fúngica oportunista, afetando, aproximadamente, 90% dos indivíduos infectados pelo HIV durante algum estágio da progressão da doença.

Estudos experimentais tem sugerido que a produção elevada de SAP é um importante aspecto na interação da *C. albicans* com o tecido do hospedeiro e a virulência da cepa (Hoegl *et al.*, 1996). Estudos de De Bernardis *et al.* (1996) e Wu *et al.* (1996) demonstraram que cepas de *C. albicans* de indivíduos HIV-positivos com candidose oral são mais proteolíticas do que isolados comensais, o que pôde ser também observado por Kuriyama *et al.* (2003) com relação a indivíduos imunocompetentes, em que a atividade de SAP de isolados com carcinoma celular escamoso, síndrome da boca queimada, xerostomia e líquen plano foi significativamente mais alta do que nos grupos saudáveis, sendo possível que alterações no ambiente promovam a seleção das cepas de *Candida* mais proteolíticas.

Candidose é a infecção fúngica mais comum em humanos após as dermatofitoses. *Candida albicans* pode ser cultivada da cavidade oral de todo indivíduo adulto (Arendorf & Walker, 1979; Odds, 1988), sendo classificada como o fungo mais potencialmente patogênico encontrado normalmente na cavidade oral. Neste local, as leveduras colonizam a língua, o palato, e a mucosa (Arendorf & Walker, 1980) e podem ocorrer na placa subgengival de adultos com periodontite severa (Slots *et al.*, 1988). Ao colonizar superfícies epiteliais, pode apresentar-se na forma de levedura. Mudanças no meio ambiente podem desencadear sua germinação. A bolsa gengival e o fluido crevicular gengival são ambientes favoráveis para germinação e crescimento da *Candida* na forma de hifa. Suas hifas tem habilidade para penetrar no tecido do hospedeiro, aderindo a uma

extensão muito maior quando comparada com a forma celular. Assim, a hifa é importante instrumento para o ataque e o processo infeccioso (Järvensivu *et al.*, 2004).

Trabalhos de Järvensivu *et al.* (2004) sugerem que *C. albicans* pode ter alguma função na infra-estrutura da placa microbiana periodontal e na sua aderência ao tecido periodontal. Assim como muitos micróbios, *Candida* também é tolerante à imunidade inata e mediada por células, conquanto provoque inflamação nos tecidos adjacentes. Observaram ainda que essa levedura foi tipicamente encontrada nas camadas externas da placa e parece agir como uma barreira entre a imunidade do hospedeiro e a camada interna do biofilme. Desse modo, *C. albicans* deve ter função na evasão imune da placa nas infecções periodontais e provoca inflamação destrutiva nos tecidos subjacentes.

Waltimo *et al.* (1997) isolaram de amostras de culturas positivas de periodontite apical um total de 7% de leveduras, tanto em cultura pura quanto junto com bactérias, e quase todos os isolados pertenciam ao gênero *Candida*, sendo a espécie mais comum *C. albicans*. Embora a candidose oral seja uma infecção fúngica oportunista que comumente afeta pacientes imunocomprometidos, é também observada em várias outras situações. Em estudos prévios de Barbachan *et al.* (1996), foi reportado associação de candidose e hiperplasia inflamatória, além afetar indivíduos que usam dentadura (Fotos *et al.*, 1992; Rindum *et al.*, 1994; Dongari-Bagtzoglou & Krashleva, 2003).

Erköse & Erturan (2007) isolaram 71 cepas de *Candida* de 64 pacientes, sendo que desses pacientes, 53 foram positivos para candidose oral. A espécie *C. albicans* foi a mais encontrada, isolada de 44/53 (83%) pacientes. Espécies não-*albicans* corresponderam a 50,9% (27/53), sendo que *C. glabrata* e *C. dubliniensis* tiveram a maior porcentagem de colonização desse pacientes, correspondendo a 22,6% e 11,3%, respectivamente.

Estudos recentes tem demonstrado que espécies não-*albicans* podem tornar-se patogênicas em pacientes HIV-negativos. Por exemplo, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *Saccharomyces cerevisiae*, foram isoladas de infecções em neonatos, pacientes com transplante de medula óssea, e de fungemia (Roilides *et al.*, 2003; Cherifi *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2004; Redding *et al.*, 2004a). O desenvolvimento de espécies de leveduras menos comuns pode ser causado pela resistência, devido a pressão dos agentes antifúngicos, como o fluconazol (Wingard *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1994; Wingard, 1994).

Ghannoum *et al.* (2010) identificaram, a partir de amostras de lavado bucal de 20 indivíduos saudáveis, através da técnica de multitag 454 pirosequenciamento (MTPS), a qual pode ser usada para caracterização detalhada dos ácidos nucléicos e tem a vantagem de precisão, flexibilidade, processos paralelos e fácil potencial de automatização, espécies de *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, Saccharomycetales, *Alternaria*, *Ophiostoma*, *Glomus*, *Phoma*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Dentre as espécies de *Candida*, foram encontradas *C. albicans* (40%), *C. parapsilosis* (15%), *C. tropicalis* (15%), *C. khmerensis* e *C. metapsilosis* (em 5% dos indivíduos). Ainda, segundo Ghannoum *et al.*, a presença de isolados de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus* na cavidade oral de indivíduos saudáveis foi um achado inesperado, uma vez que esses fungos não são descritos como colonizadores da cavidade oral. É possível que a patogenicidade desses fungos seja controlada em indivíduos saudáveis por outros fungos do microbioma oral, assim como pelo sistema imune funcional.

Morrel *et al.* (2005) demonstraram que um rápido início na terapia antifúngica no começo da candidemia está associado com redução na mortalidade. Pacientes que receberam terapia antifúngica em até 12 horas após resultado positivo para cultura de sangue tiveram menor mortalidade hospitalar do que aqueles que receberam terapia após 12 horas (11,1% versus 33,1%).

Trabalhos de Ortega *et al.* (2010) realizados em dois períodos (A e B) durante 15 anos, isolaram 262 episódios de candidemia no período A (de 1994 a 2003) e 171 episódios no período B (de 2004 a 2008). Ocorreram 94 (36%) de mortes no período A e 38 (22%) no período B. *Candida albicans* foi a espécie mais isolada (49%), seguida por *C. parapsilosis* (18%), *C. tropicalis* (14%), *C. glabrata* (12%), *C. krusei* (5%) e outras espécies (3%).

Candida guilliermondii não é frequentemente isolada de culturas de sangue (1 a 5%) (Krcmery & Barnes, 2002), e infecções causadas por essa espécie tem sido reportadas em pacientes com câncer, pós-cirúrgico e em unidades de terapia intensivas (Krcmery *et al.*, 1999; Krcmery & Barnes, 2002). Neutropenia e transplante de medula óssea foram considerados como fatores de risco para adquirir *C. guilliermondii* durante infecções (Vazquez *et al.*, 1995).

2.6 Resistência aos Antifúngicos

Nas recentes décadas, a ocorrência de infecções sistêmicas fúngicas tem aumentado, juntamente com o crescente número de indivíduos imunocomprometidos, cuja população aumenta em paralelo devido a pandemia da AIDS, tratamento de quimioterapia contra o câncer e transplante de órgãos. Entre essa população, especialmente aqueles infectados com o HIV, são geralmente administradas baixas doses de fluconazol profilaticamente para prevenir a ocorrência de infecções fúngicas oportunistas. Desta maneira, tratamentos prolongados resultam no aparecimento de fenótipos de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos azólicos (White *et al.*, 1998; Kontoyiannis & Lewis, 2002). Candidose orofaríngea juntamente com resistência cruzada a antifúngicos é um dos maiores problemas enfrentados por pacientes HIV positivos (Vanden Bossche *et al.*, 1994). Pacientes imunossuprimidos apresentam elevado risco de contrair infecção com organismos resistentes, assim como pacientes que tiveram exposição a altas doses de fluconazol (>10g), ou tratamento com longa duração (Maenza *et al.*, 1996).

Dentre as espécies de *Candida* causando infecções, Redding *et al.* (2004a, b) isolou a espécie *C. glabrata* de pacientes que passaram por transplante de medula óssea e de candidose orofaríngea de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Fungemia por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi encontrada em neonatos com candidose oral, infectados por *C. glabrata* (Roilides *et al.*, 2003). Trabalhos de Kantarcioglu & Yücel (2002) observaram resistência *in vitro* de cepas de *C. dubliniensis* ao fluconazol e cetoconazol, sendo adquirida durante o tratamento com essas drogas e à sua exposição repetida. Furletti (2006) observou que 108 isolados de *Candida* spp. provenientes de pacientes portadores de doença periodontal foram resistentes a anfotericina B. Menezes *et al.* (2009) isolaram 51 cepas de *C. tropicalis* provenientes de pacientes internados no Hospital Geral de Fortaleza, onde três cepas foram resistentes ao fluconazol e itraconazol, sendo todas sensíveis a anfotericina B. Fungemia por *C. rugosa* foi observado por Mincez *et al.* (2009), sendo que essa espécie vem sendo conhecida como um patógeno emergente, com uma frequência de isolamento crescendo de 0,03% para 0,4% entre os anos de 1997 a 2003 (Pfaller *et al.*, 2006).

Candida krusei é uma espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol e teve sua suscetibilidade diminuída a anfotericina B e flucitosina (Pfaller *et al.*, 2008). Foi primeiramente isolada de pacientes com câncer e de locais onde o fluconazol é usado como profilaxia (Wingard *et al.*, 1991; Girmenia *et al.*, 2005). A frequência de candidemia causada por essa espécie varia de 2% a 60% (Sandven, 2000; Viudes *et al.*, 2002; Pemán *et al.*, 2005), dependendo da instituição e da unidade de admissão. Comparando as infecções causadas por outras *Candida* spp., as provocadas por *C. krusei* estão associadas com um alto nível de mortalidade (Muñoz *et al.*, 2005; Pemán *et al.*, 2005).

A espécie *Candida dubliniensis* vem sendo reconhecida como constituinte minoritário da microbiota oral humana, e vários trabalhos indicam que seu significado clínico se deve à associação com o vírus HIV (Coleman *et al.*, 1997; Sullivan & Coleman, 1997; Sullivan & Coleman, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999) e à sua habilidade de desenvolver rápida resistência ao fluconazol (Sullivan & Coleman, 1998; Pfaller *et al.*, 1999). Várias investigações sugerem que a resistência ao fluconazol pode ser induzida em pacientes que estão sob um período prolongado de tratamento (Ruhnke *et al.*, 2000). Estudos de Jabra-Rizk *et al.* (1999) encontraram cepas de *C. dubliniensis* isoladas de pacientes HIV-positivos, e trabalhos de Meis *et al.* (1999) observaram infecção em pacientes imunocomprometidos, incluindo indivíduos HIV-positivos e pacientes com câncer, recebendo quimioterapia. No entanto, Polachek *et al.* (2000) e Meis *et al.* (2000) isolaram cepas de *C. dubliniensis* de pacientes HIV-negativos, demonstrando que essa espécie não atinge apenas indivíduos HIV-soropositivos.

Outro fator que pode influenciar o transporte da levedura *Candida* é o uso de agentes antifúngicos. Nistatina, anfotericina B e fluconazol tem sido usados por muitos anos por pacientes infectados com o HIV em terapias prolongadas (Greespan, 1994). O desenvolvimento de resistência ao fluconazol é uma tendência que tende a evoluir. Em 1995, 40% dos pacientes em terapia prolongada, portavam cepas resistentes; em 1997 aumentou para 43%; e 45% em 2000 (Johnson *et al.*, 1995; Tumbarello *et al.*, 1997; Magaldi *et al.*, 2001).

A resistência clínica pode ser definida como o fracasso da atividade do agente antifúngico ao tentar erradicar a infecção fúngica contra o microrganismo. Essas falhas

podem ser atribuídas a uma combinação de fatores relatados ao hospedeiro, ao agente antifúngico ou ao patógeno (Kanafani & Perfect, 2008).

Antes da introdução da terapia anti-retroviral, houve um aumento na prevalência de *C. albicans* resistentes ao fluconazol entre pacientes HIV infectados com candidose orofaríngea ou esofageal. O amplo uso de itraconazol e fluconazol é considerado o principal causador da resistência aos azóis (Goldman *et al.*, 2000). Mais de um terço de pacientes com AIDS em estágio avançado abrigavam *C. albicans* resistentes ao fluconazol em suas cavidades orais (Law *et al.*, 1994). *Candida albicans* resistentes aos azóis são menos comuns em pacientes com outras doenças, como candidose vaginal (Ribeiro *et al.*, 2005) e candidemia (Sanglard & Odds, 2002).

Os azóis são uma classe de drogas antifúngicas que incluem os triazólicos, como o fluconazol, e imidazólicos, como o cetoconazol, que inibem a biossíntese do ergosterol por inibição competitiva da enzima lanosterase 14 α -demetilase. Hoje em dia, múltiplos mecanismos de resistência ao fluconazol da *C. albicans* foram identificados e incluem mutações putativas no gene ERG11, que codifica a enzima lanosterase 14 α -demetilase, alterações em outros genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, e diminuição do acúmulo intracelular do fluconazol via associação da bomba de efluxo e membrana (White *et al.*, 1998; Kontoyiannis & Lewis, 2002; Sanglard, 2002). Entre as quatro principais classes de bomba de efluxo, duas foram identificadas em *C. albicans* como pertencendo à superfamília facilitadora principal (MDR), a qual funciona como um antiporto de íons H⁺, ou a superfamília de cassete ligadora de ATP (CDR), a qual requer ATP para ativar o transporte de fluconazol para fora da célula fúngica (White *et al.*, 2002).

Os polienos agem interagindo com o ergosterol da membrana fúngica, formando, subseqüentemente, canais de porina que permitem a perda do potencial intramembrana e da função celular (Kanafani & Perfect, 2008). Embora a resistência a anfotericina B entre cepas de *Candida* spp. seja rara (Tortorano *et al.*, 2005), há várias informações recentes do aumento da concentração inibitória mínima (CIM) a anfotericina B entre isolados de *C. krusei* e *C. glabrata* (Pfaller *et al.*, 2004b). Em adição, resistência intrínseca aos polienos é freqüentemente notada em *C. lusitaniae* (Pfaller *et al.*, 1994). Uma prévia avaliação demonstrou que a mesma CIM da anfotericina B pode corresponder a diferentes atividades

fungicidas, dependendo da espécie de *Candida*, ou da cepa testada, e cada espécie tem um diferente padrão para a atividade da anfotericina B (Cantón *et al.*, 2004).

Candidose invasiva é uma importante causa de complicações e morte em pacientes hospitalizados. A anfotericina B foi utilizada como tratamento padrão por cinco décadas, mas seus efeitos tóxicos limitaram seu uso. Fluconazol é empregado no tratamento de candidemia em pacientes com neutropenia (Rex *et al.*, 1994). No entanto, algumas espécies de *Candida*, como *C. krusei* e *C. glabrata*, são freqüentemente resistentes ao fluconazol. Este fato e a atividade fungistática dos triazóis constituem as principais limitações do fluconazol como primeira linha na terapia para candidemia. Após os estudos de Mora-Duarte *et al.* (2002), Reboli *et al.* (2007) e Kuse *et al.* (2007), equinocandinas surgiram como importantes agentes para o tratamento de candidose invasiva. A atividade da droga equinocandina é fungicida e seu espectro inclui todas as espécies de *Candida*. Recentemente, guias para o tratamento de pacientes com candidose invasiva e mucosa recomendam fluconazol ou equinocandina como terapia inicial para muitos pacientes adultos (Pappas *et al.*, 2009).

Equinocandinas inibem a síntese de β -1,3-D glucano, o qual é integrante da estrutura e função da parede celular fúngica. A formação de uma parede celular defeituosa proporciona a ruptura da célula nas leveduras e crescimento anormal das hifas nos bolores. As equinocandinas são altamente efetivas contra espécies de *Candida* e de *Aspergillus* (Espinel-Ingroff, 2003). Entre as espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* tem um valor mais alto da CIM do que *C. albicans* (Mora-Duarte *et al.*, 2002). Os mecanismos de resistência a equinocandina ainda estão sendo investigados. Em espécies de *Candida*, resistência secundária é associada com mutações putativas no gene Fks1 da síntese de β -1,3-D glucano (Balashov *et al.*, 2006).

Os danos causados ao hospedeiro podem se manifestar de dois diferentes modos: infecções superficiais na pele, nas membranas mucosas ou epiteliais; ou penetração invasiva nas camadas profundas do tecido, distribuição pelo sangue e disseminação em vários órgãos. Mudanças na composição qualitativa e quantitativa da flora bacteriana no trato gastrointestinal – por exemplo, após administração de antibióticos (Piispanen & Hogan, 2008) – ou deficiência no sistema imune do hospedeiro aumentam a virulência de

cepas de *Candida* através de mecanismos de regulação de genes (Calderone, 2001; Thewes *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2009).

Leveduras patogênicas transportam genes codificadores para fatores de patogenicidade específicas e para outras importantes propriedades no processo de infecção (Morschhäuser *et al.*, 2000; Thewes *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2009). Estes incluem primeiramente fatores de adesão, que ligam as leveduras às superfícies da célula, como o epitélio ou endotélio, e fatores agressivos, destruindo tecidos e secretando proteinase aspartato, fosfolipases e lipases. Fatores agressivos são, em parte, responsáveis pela invasão do fungo (Kumamoto & Vines, 2005). Cepas de *Candida* extremamente virulentas são capazes de expressar vários fatores de virulência simultaneamente (Calderone, 2002; Magee & Chibana, 2002; Noverr & Huffnagle, 2004; Nobile & Mitchell, 2006). Além disso, leveduras patogênicas desenvolveram mecanismos de escape para evitar o ataque do sistema imune (Raska *et al.*, 2007).

Sabe-se que existem, pelo menos, quatro mecanismos básicos que conferem resistência ao fluconazol: (i) mutações no gene ERG11, que codifica alvos intracelulares para antifúngicos azólicos, como a enzima lanosterase C14 α -demetilase, prevenindo a ligação dos azóis ao sítio enzimático (Loffler *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998; Yang & Lo, 2001); (ii) alteração das enzimas envolvidas com o alvo; (iii) exposição aos compostos azólicos resulta na deleção do ergosterol da membrana fúngica e acúmulo de produto tóxico, como 14 α -metil-3,6-diol, interrompendo seu crescimento; mutações no gene ERG3 previne a formação de 14 α -metil-3,6-diol (Kelly *et al.*, 1997). Reposição do ergosterol permite a formação de uma membrana funcional e inibe a ação da droga na biossíntese do ergosterol. Cepas de *Candida* com mutação no gene ERG3 são também resistentes aos polienos (Kanafani & Perfect, 2008); e (iv) o desenvolvimento da bomba de efluxo ativa resulta na diminuição da concentração da droga no local de ação. Bombas de efluxo são codificadas nas espécies de *Candida* por duas famílias de genes transportadores, CDR e MDR (Albertson *et al.*, 1996; Sanglard *et al.*, 1997; Wakiec *et al.*, 2007).

Estudos com isolados resistentes a agentes azólicos tem demonstrado aumento da energia-dependente do efluxo desses antifúngicos em *C. glabrata* (Hitchcock *et al.*, 1993; Parkinson *et al.*, 1995; Marichal *et al.*, 1997), diminuição da concentração intracelular de

azóis em *C. albicans* e em *C. glabrata* (Ryley *et al.*, 1984; Hitchcock *et al.*, 1987; Hitchcock *et al.*, 1993), e aumento da expressão dos genes transportador multidrogas CDR1, CDR2 e MDR1 em *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1995; Albertson *et al.*, 1996; Sanglard *et al.*, 1997; White, 1997). Inativação do gene CDR1 em *C. albicans* permite o aumento da suscetibilidade ao fluconazol e de sua concentração intracelular (Sanglard *et al.*, 1996). A levedura *C. glabrata* é inerentemente mais resistente ao fluconazol do que *C. albicans* e é mais comumente encontrada em pacientes recebendo antifúngicos azólicos (Sangeorzan *et al.*, 1994), sendo que essa resistência pode crescer muito mais se o paciente continuar a terapia por um período prolongado (Warnock *et al.*, 1988).

Aumento da prevalência de resistência microbiana aos fármacos antifúngicos comerciais tem sido observado (Drago *et al.*, 2000). A baixa eficácia terapêutica observada em algumas infecções pode ser devido à ineficiente penetração dos fármacos nas células infectadas, não permitindo que o fármaco alcance a levedura (Drago *et al.*, 2000). Todos esses aspectos fazem com que a procura por novos compostos antimicrobianos seja importante, incluindo aqueles que podem estar presentes nos extratos de plantas (Filoche *et al.*, 2005).

Assim, o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas e o estudo dessas plantas, que contem milhares de diferentes metabólitos secundários, envolvendo o princípio ativo, é um campo promissor para descoberta de novos fitomedicamentos para o tratamento alternativo de doenças (sejam elas provocadas por bactérias ou fungos), considerando que encontramos na literatura diversos estudos demonstrando seus efeitos, em particular, antimicrobianos e antifúngicos sobre microrganismos de interesse médico, além de apresentarem um tratamento significativo em cepas resistentes e não provocarem efeitos colaterais tão perigosos para a saúde, justificando as pesquisas com propósitos de avaliar o potencial de ação antimicrobiana desses fitoterápicos. Este estudo permitirá identificar novas alternativas terapêuticas capazes de inibir a proliferação microbiana do gênero *Candida* com eficácia, segurança e qualidade padronizada.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* a partir da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos brutos da *Punica granatum* sobre cepas padrão de *Candida* spp.
2. Identificar por espectrometria de massas substâncias envolvidas com a atividade antimicrobiana.
3. Observar, por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, as alterações estruturais provocadas pelos extratos com melhores atividades, distinguindo, desse modo, o local de ação do extrato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planta

O material vegetal, *Punica granatum* (Linnaeus), família *Punicaceaea*, foi colhido da Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas (CPMA), Divisão Agrícola, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), sob responsabilidade da Profa. Dra. Glyn Mara Figueira. A exsicata número 1.223, da espécie estudada, está depositada no herbarium do CPMA/UNICAMP. Foi utilizada a planta fresca para a obtenção dos extratos.

4.2 Preparo dos extratos

Para definir qual tipo de extrato seria selecionado – se apolar (solvente diclorometano) ou polar (solvente metanol e aquoso) –, foram feitas as extrações da folha e do fruto, denominado de Fruto Novo, da *Punica granatum* colhido em 19/03/2008 do campo do CPMA, e do fruto que estava estocado no freezer, denominado de Fruto Estoque, a partir de 5,0g de amostra, para observar qual dessas amostras apresentaria atividade sobre as cepas de leveduras. Para a extração com o solvente diclorometano, etanol e água, seguiu-se a metodologia utilizada no laboratório da Divisão de Fitoquímica do CPQBA, descrita na Figura 1:

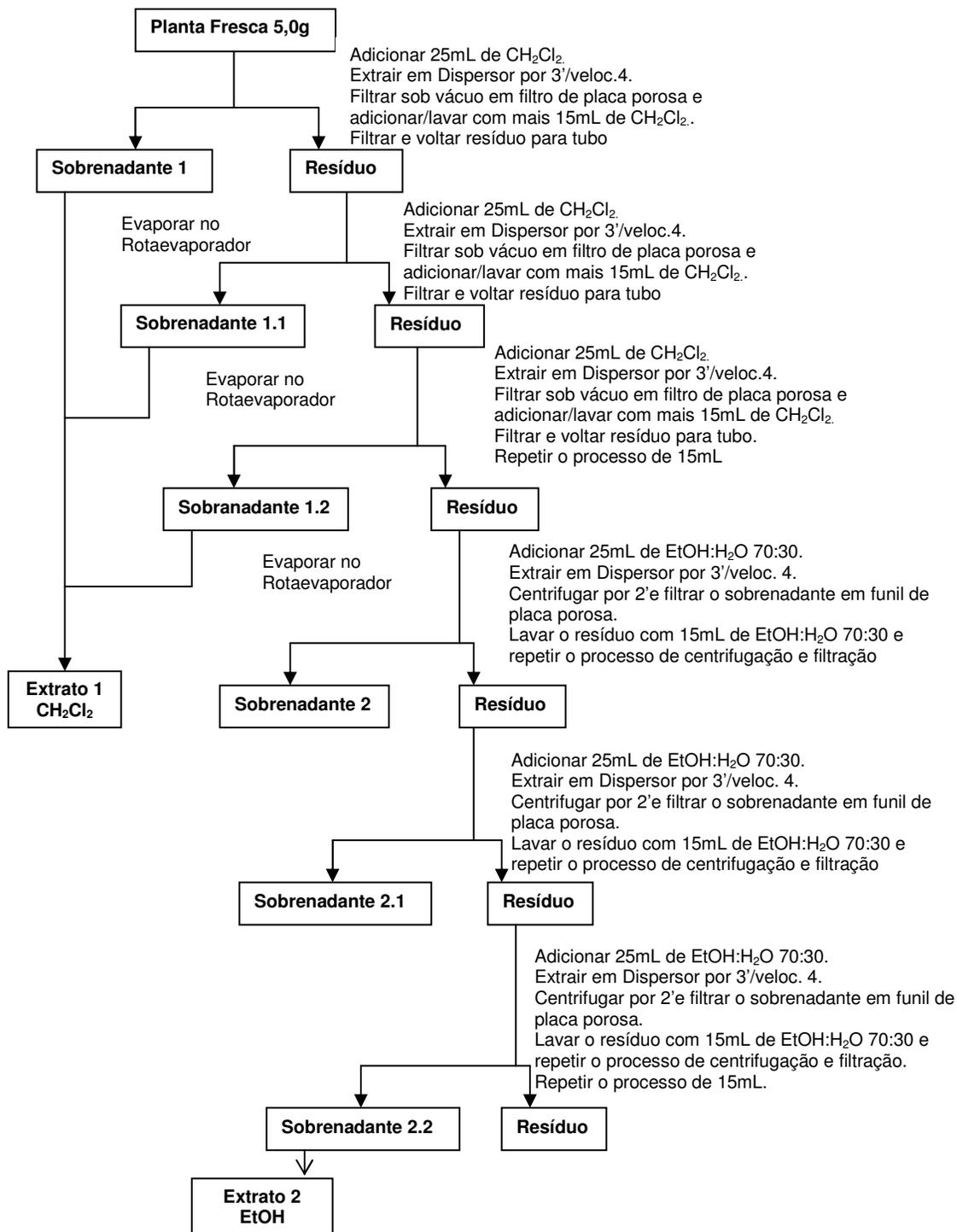


Figura 1 - Extração das amostras com os solventes diclorometano (CH₂Cl₂), etanol (EtOH) e água (H₂O), através do aparelho Dispensor. Material fresco.

(Continuação) Figura 1

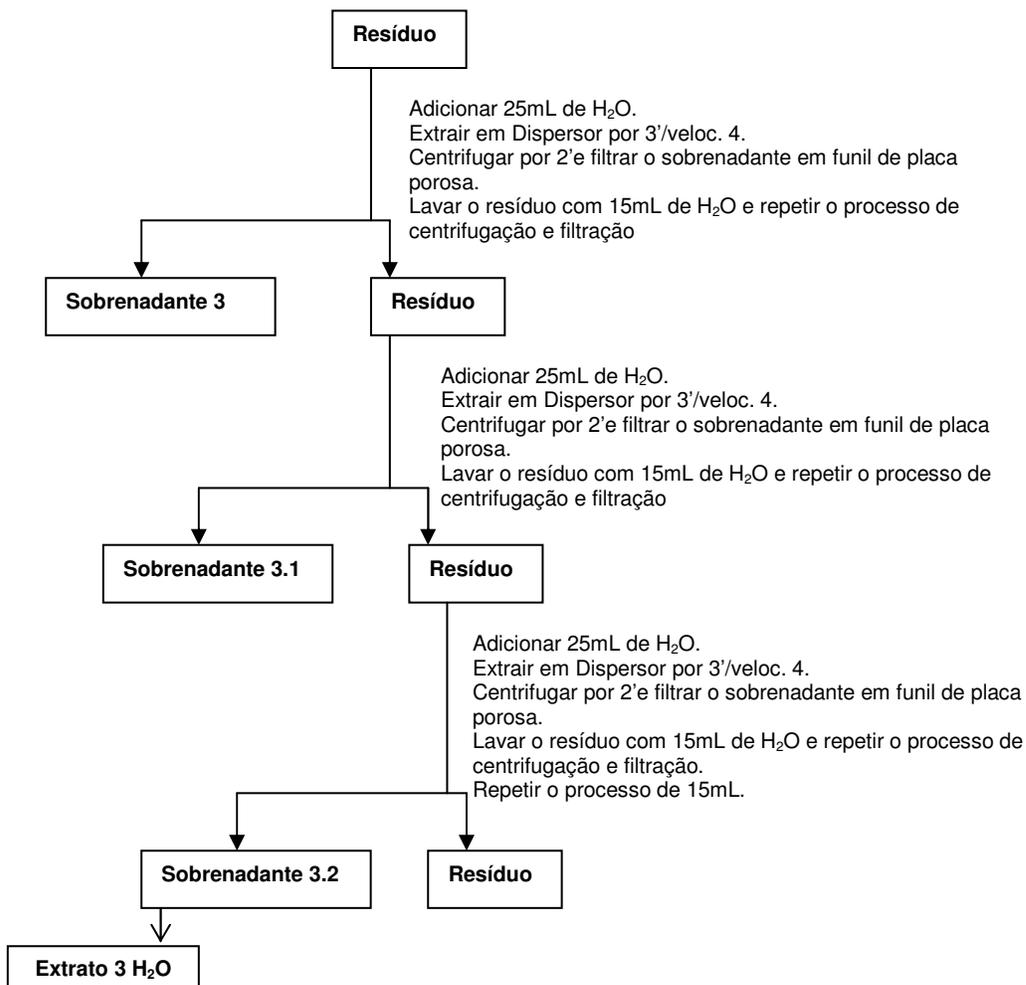


Figura 1 - Extração das amostras com os solventes diclorometano (CH₂Cl₂), etanol (EtOH) e água (H₂O), através do aparelho Dispensor. Material fresco (continuação).

Foram obtidos nove tipos de extratos: Folhas Diclorometano, Folhas Etanol e Folhas Aquoso; Fruto Novo Diclorometano, Fruto Novo Etanol e Fruto Novo Aquoso; Fruto Estoque Diclorometano, Fruto Estoque Etanol e Fruto Estoque Aquoso.

Através dos resultados observados dos extratos acima, foi decidido investigar a atividade do extrato Fruto Novo Etanol. Para tanto, uma nova extração pelo processo de maceração foi realizada. O material vegetal moído foi extraído por maceração com etanol 95% até esgotar a planta. Os filtrados recolhidos foram tratados com Na₂SO₄ anidro (para

remoção da água) e filtrados. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo, na temperatura de aproximadamente 55°C, até completa eliminação do etanol e posteriormente liofilizado fornecendo o extrato bruto etanólico.

Através da Cromatografia de Camada Delgada, com os eluentes butanol/ácido acético/água 40/10/50%, e o revelador ácido sulfúrico concentrado (anissaldeído), foi possível observar a presença de substâncias fenólicas. Então, foi realizado um novo método de extração, denominado de Tratamento Enzimático, com a enzima xilanase da bactéria *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 (Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria), Divisão de Microbiologia, do CPQBA/Unicamp, sob supervisão da Dra. Marta C. T. Duarte conforme pode-se ver na Figura 2.

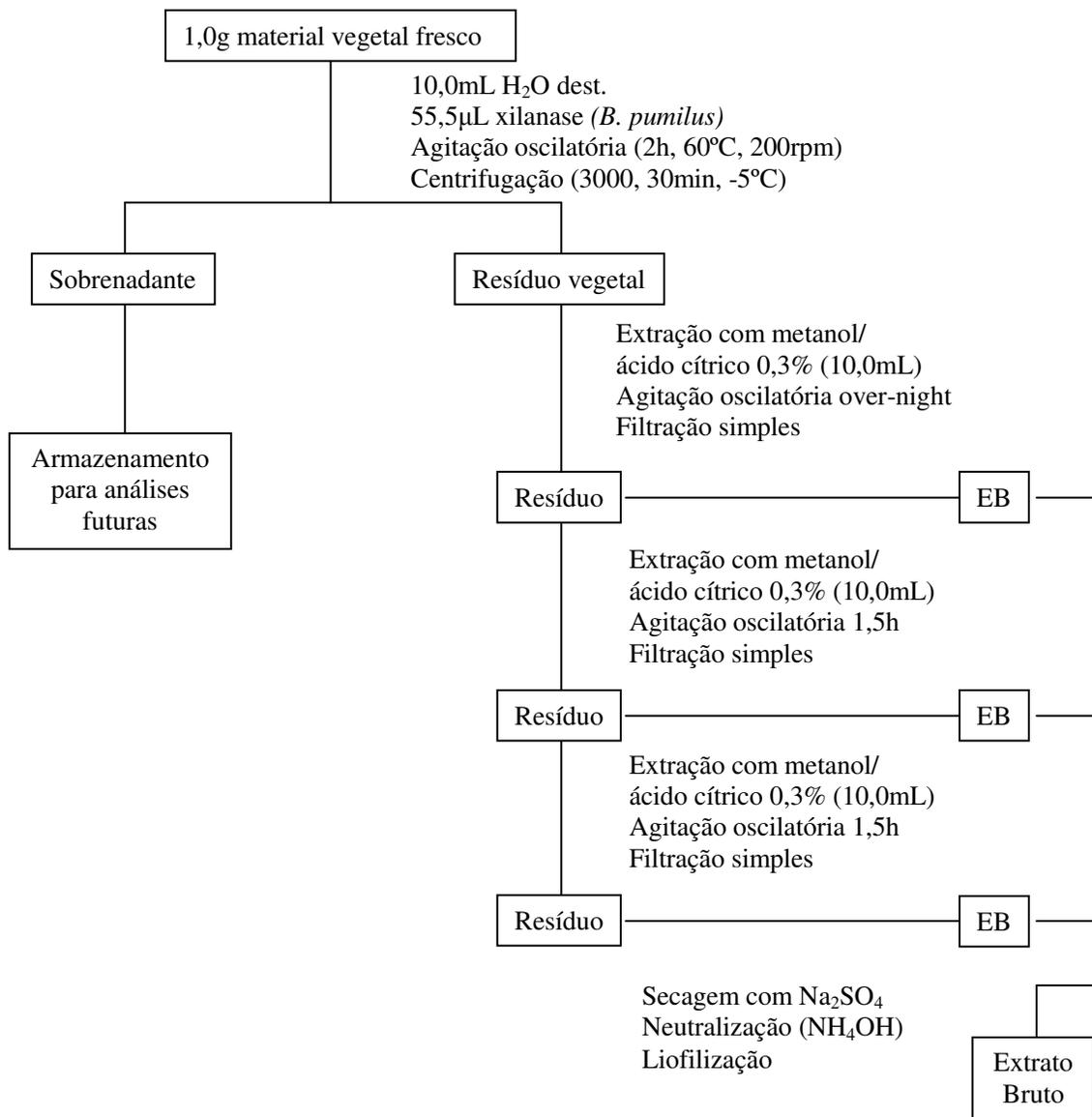


Figura 2 - Extração das amostras com a enzima xilanase da bactéria *Bacillus pumilus*.

Para monitorar se essa enzima teria ou não atividade sobre as leveduras, foi realizada também a extração Branco, sem a presença da enzima xilanase (Figura 3).

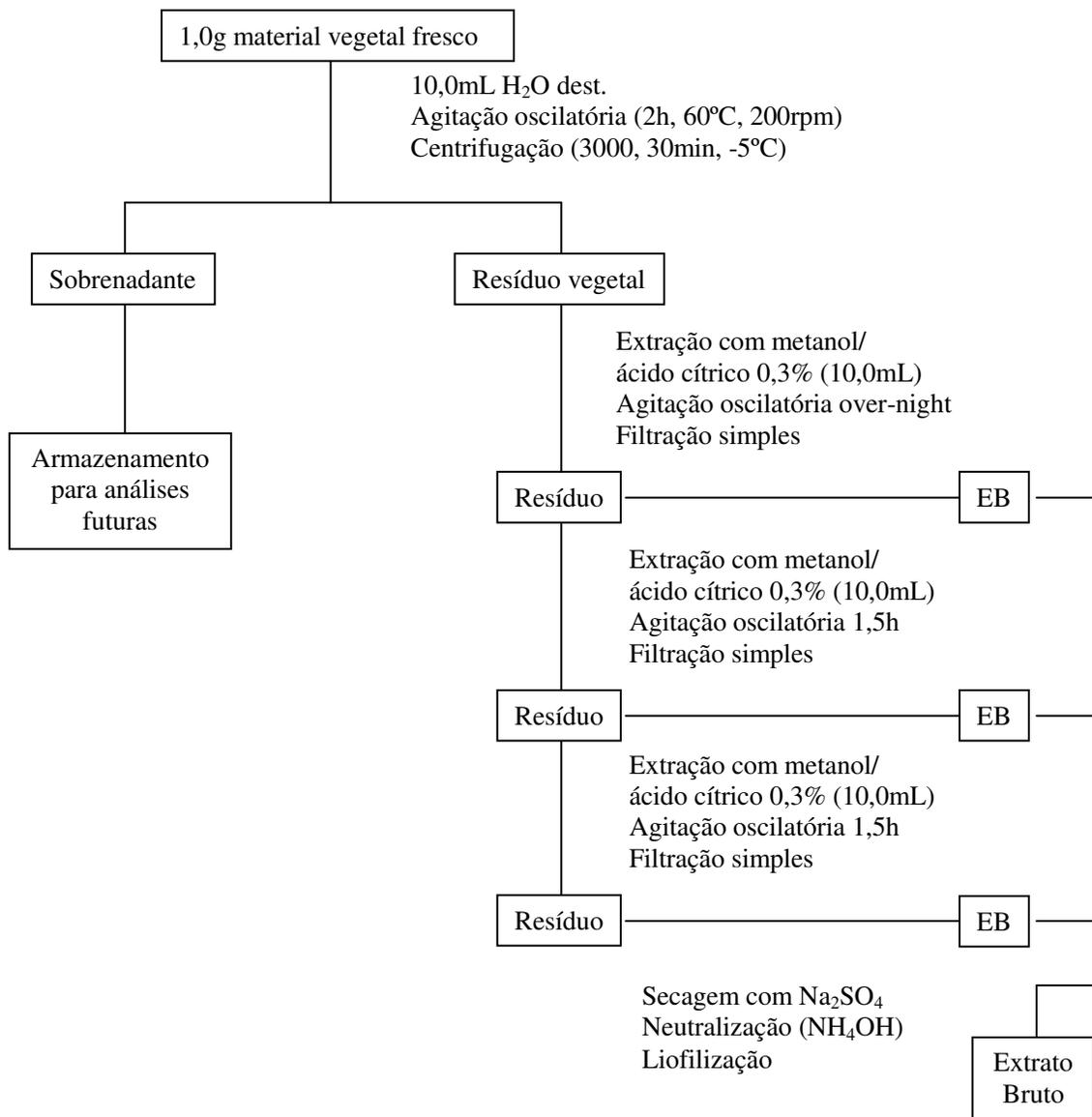


Figura 3 - Extração das amostras sem a enzima xilanase (Branco)

Através dessa metodologia, foi feita a segunda triagem, com novas amostras, a saber: Folhas I, Frutos I (imaturos), Folhas II, Frutos II (maduros), extrato etanol do fruto macerado (EtOH) e Suco, da qual obtivemos os seguintes extratos: Folhas I Enzima, Folhas I Branco, Frutos I Enzima, Frutos I Branco, Folhas II Enzima, Folhas II Branco, Frutos II Enzima, Frutos II Branco, EtOH Enzima, EtOH Branco, Suco Enzima e Suco Branco.

A terceira triagem se deu com o fruto inteiro da romã e, separadamente, a casca, o pericarpo e os arilos mais sementes, seguindo a metodologia apresentada na Figura 1, apenas com o solvente etanol. O material foi coletado em 18/01/2010 do campo do CPMA.

4.3 Monitoramento dos extratos

Os extratos brutos foram monitorados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), em cromatoplasmas de silicagel (60 F254 Merck 1.05554), uma técnica simples e muito importante para análises qualitativas rápidas, extremamente efetiva e conveniente para o isolamento de pequenas quantidades de frações de misturas complexas ou na purificação de substâncias. Ela é utilizada para identificar componentes de uma mistura comparando-os com padrões, acompanhar o processo de uma reação pelo aparecimento dos produtos e para um simples monitoramento das condições de extração.

Elui-se as cromatoplasmas em sistemas de solventes utilizando gradientes de diclorometano e metanol conforme a polaridade do extrato bruto. Para extratos altamente polares (etanol e aquoso) utilizou-se o eluente butanol/ ácido acético glacial/ água (40/10/50%). A detecção dos compostos foi feita por luz ultravioleta e, em seguida, por pulverização com anisaldeído e revelador NPEG, em estufa Corporation-Precision (110°C, 10 minutos). As placas foram digitalizadas.

4.4 Diluição dos extratos

Os extratos brutos foram diluídos a uma concentração de 5mg/mL, com DMSO (dimetil sulfóxido) a 1%, adicionada água destilada na proporção adequada, e estocados em freezer. Adicionou-se água destilada estéril para diluir os extratos para uma concentração final de 4mg/mL, obtendo-se, em seguida, as demais diluições.

4.5 Cepas de Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de referência de diversas espécies de *Candida* spp., obtidas da coleção Holandesa CBS e do Banco da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, *Candida albicans* (CBS 562), *C. dubliniensis* (CBS 7987), *C. tropicalis* (CBS 94), *C. krusei* (CBS 573), *C. guilliermondii* (CBS 566), *C. utilis* (CBS 5609), *C. parapsilosis* (CBS 604), *C. lusitaniae* (IZ 06), *C. glabrata* (IZ 07) e *C. rugosa* (IZ 12), provenientes da Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP (CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures; IZ – Instituto Zimotécnico – ESALQ/USP).

4.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método da Microdiluição

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foi feito através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 (CLSI, 2002). Culturas de 24 horas foram preparadas em salina 0,9% (5mL), comparando-se a turbidez com a escala de Mc Farland (0,5) e ajustando sua absorbância entre 0,08 a 0,10A, a 530nm, com uma concentração equivalente a $5,0 \times 10^6$ céls/mL. Em seguida, foi feita diluição seriada, chegando a uma concentração de $5,0 \times 10^3$ céls/mL em caldo de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Os extratos foram sequencialmente diluídos, partindo da solução de 4mg/mL para uma concentração de 1.000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, 31,5µg/mL, 15,6µg/mL e 7,8µg/mL.

4.7 Diluição do antifúngico nistatina

A partir de 50mg do antifúngico nistatina (Calbiochem, La Jolla, CA), dilui-se em 10mL de água destilada estéril, obtendo-se uma solução estoque de 5mg/mL (5000µg/mL). Desta solução-mãe, uma solução trabalho foi feita, com uma concentração de 1mg/mL e estocada em freezer. A partir desta solução trabalho, no momento do teste, foi adicionado 100µL do antifúngico na placa de 96 poços juntamente com 100µL de BHI, diluindo,

assim, seqüencialmente. Em seguida, foi adicionado o inóculo. O teste foi feito em triplicata.

4.8 Teste da suscetibilidade

Adicionou-se 100µL de caldo de cultura + 100µL do extrato, diluindo-o seqüencialmente, + 100µL do inóculo na placa de 96 poços, nas colunas de 2, 3 e 4, de A a H, testes feitos em triplicata. As colunas 5 e 6, de A a H, continham o controle do extrato, diluído seqüencialmente; nas colunas 7, 8 e 9, de A a H, o inóculo + nistatina, nas concentrações de 250µg/mL até 1,9µg/mL, com seu controle nas colunas 10 e 11. Foram feitos os controles na coluna 1 das cepas (controle positivo), e na coluna 12 do caldo de cultura BHI, salina e DMSO 1% (controle negativo), como observado na Figura 4. A seguir, as leveduras foram incubadas em estufa de aerobiose a 37°C por 24 a 48 horas. Após esse período, alíquotas dos poços onde não era observado crescimento (visivelmente), eram inoculadas em meio ágar Sabouraud Dextrose (SDA - Sabouraud Dextrose Agar) para determinar se a atividade do extrato era fungicida ou fungistática, ou seja, sua concentração fungicida mínima (CFM).

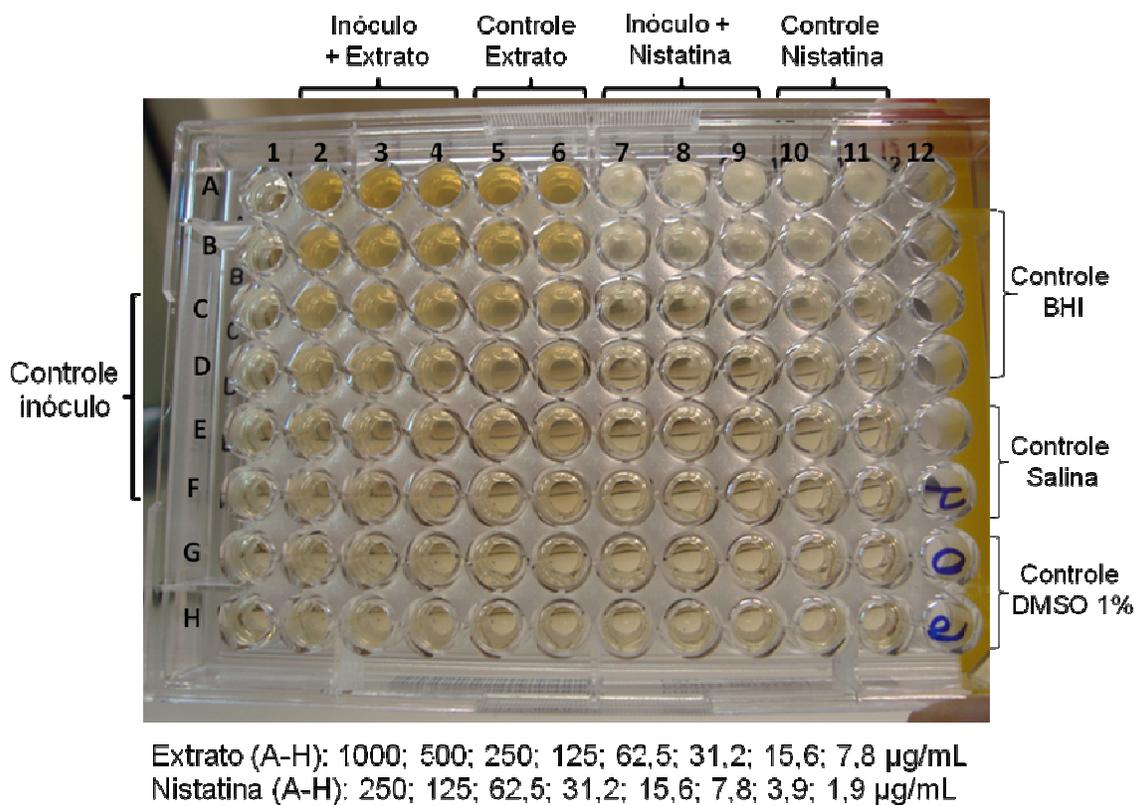


Figura 4: Representação da distribuição do inóculo, extrato, nistatina e controles na placa de 96 poços.

4.9 Espectrometria de Massas

4.9.1 Análise

A Espectrometria de Massas (MS) hoje constitui uma das técnicas instrumentais mais abrangentes da ciência, com amplas aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Isto se deve a recentes avanços em instrumentação e ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização que a revitalizaram.

A Espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas

moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass to charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (Van Bramer, 1998).

A análise das amostras dos extratos arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro da *Punica granatum* por Espectrometria de Massas e de Massas/Massas com ionização por electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS) utilizando o equipamento Q-Tof (Micromass - UK) foi feita no Laboratório Thomson, IQ-UNICAMP. As espécies foram protonadas $[M+H]^+$, ou formaram íons adutos de sódio $[M+Na]^+$ ou de potássio $[M+K]^+$.

4.9.2 Preparo da Amostra

As amostras citadas acima foram dissolvidas em metanol puro e 100uL desta solução foram diluídos em 900uL de uma mistura de metanol/água 50% (v/v), com ácido fórmico 0,1%.

4.9.3 Obtenção dos espectros de massas

As amostras dos extratos arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro da *Punica granatum* foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram extraídos no modo positivo. As condições de operação do equipamento para as análises foram: 3.0kV voltagem do capilar, 100°C temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação de 100°C, e voltagem do cone de 70V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 10μL/min. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 10 a 2000. Os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de 25 a 70eV a

partir de m/z 50 até um valor pouco acima do íon em estudo. Os espectros foram tratados com o software MassLynx 4.1.

4.10 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão

4.10.1 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

O preparo dos inóculos *C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 573, seguiu o mesmo padrão de preparo, conforme descrito no Item 4.5. A cada 0,9mL da suspensão de células leveduriformes foi acrescentado 0,1mL dos extratos pericarpo e casca da *Punica granatum*, em diferentes concentrações e incubadas por 24h a 37°C. Após esse período, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com tampão fosfato (pH 7,4) e adicionado glutaraldeído a 2% (v/v), por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas com banhos seqüenciais de etanol, nas concentrações de 50%, 70%, 90% e etanol absoluto (2X). Na seqüência, foi feita a metalização com ouro, durante 120 segundos, em um metalizador BAL-TEC SCD 050 (Balzers Liechtensteins). A análise das amostras foi levada a efeito em um Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-5600 Lv da JEOL (Tóquio, Japão), operando com aceleração de 15KV. Ao controle foram adicionadas apenas as amostras microbianas.

4.10.2 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão

O preparo dos inóculos *C. albicans* CBS 562, seguiu o mesmo padrão de preparo, conforme descrito no Item 4.5. A cada 0,9mL da suspensão microbiana foi acrescentado 0,1mL dos extratos pericarpo e casca da *Punica granatum*, em diferentes concentrações e incubadas por 24h a 37°C. Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com tampão fosfato (pH 7,4) e adicionado glutaraldeído a 2,5% tamponado em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 – de 4 a 6 horas na geladeira (4-6°C).

No laboratório de microscopia eletrônica da FOP/UNICAMP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 por 1 hora em temperatura ambiente. Seguiu-se com outra lavagem, com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e, então, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona P.A. (Merck, German) 50%, 70%, 90% e 100% (duas vezes), por 5 minutos cada troca.

Após, seguiu-se a infiltração gradual em mistura contendo acetona + resina Dr. Spurr (Anexo 2), sendo a primeira: 3 partes de acetona + 1 parte de resina (4 horas em mesa orbital); a segunda: 1 parte de acetona + 1 parte de resina (over night em mesa orbital) e a terceira: 1 parte de acetona + 2 partes de resina (8 horas em mesa orbital) e infiltração em resina pura por 24 horas à temperatura ambiente, em agitação, seguida pela inclusão em resina pura, permanecendo em estufa a 60°C por 48h para polimerização da resina. Após os blocos serem polimerizados, foram obtidos cortes semi-finos com 1µm de espessura utilizando um ultramicrotomo MT2B (Sorvall Porter Blum) com navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% em borato de sódio e observados em microscópio de luz, com a finalidade de selecionar a área a ser estudada. Em seguida, os blocos foram triados e cortes de 70-90nm de espessura foram obtidos em um ultramicrotomo MT2C (RMC) equipado com navalha de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre (200 mesh) e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As grades contendo os cortes foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão EM-10 (Zeiss), operando com aceleração de 60Kv, do Núcleo de Apoio à Pesquisa, Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP (Responsável: Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima).

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antifúngica dos extratos diclorometano, etanol e aquoso

A atividade antifúngica dos extratos brutos diclorometano, etanol e aquoso, e do antifúngico nistatina, podem ser observados na Tabela 1, apresentando os valores de CIM sobre as cepas de leveduras com 24 horas de leitura. Desses extratos, observa-se melhor atividade dos extratos de maior polaridade, ou seja, etanol e aquoso, com CIM entre 125µg/mL a 1000µg/mL.

Tabela 1 - Resultado da leitura visual (formação de depósitos/colônias no fundo do poço e/ou turvação) do extrato diclorometano, etanol e aquoso, e do antifúngico (µg/mL) após 24h:

Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Folhas D	*	*
Fruto Estoque D	*	*
Fruto Novo D	1000	1000
Folhas E	250	250
Fruto Estoque E	1000	1000
Fruto Novo E	500	500
Folhas A	125	250
Fruto Estoque A	500	500
Fruto Novo A	500	500
Nistatina	1,9	1,9

*: Valores de CIM maiores que 1000µg/mL; D: extrato diclorometano; E: extrato etanol; A: extrato aquoso

Após 48 horas de crescimento, houve alteração da atividade do extrato etanol, sendo que o extrato aquoso apresentou os mesmos resultados da leitura anterior (24 horas), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da leitura visual (formação de depósitos/colônias no fundo do poço e/ou turvação) do extrato diclorometano, etanol e aquoso, e do antifúngico ($\mu\text{g/mL}$) após 48h:

Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Folhas D	*	*
Fruto Estoque D	*	*
Fruto Novo D	1000	1000
Folhas E	500	500
Fruto Estoque E	1000	1000
Fruto Novo E	1000	1000
Folhas A	250	500
Fruto Estoque A	500	500
Fruto Novo A	500	500
Nistatina	7,8	7,8

*: Valores de CIM maiores que $1000\mu\text{g/mL}$; D: extrato diclorometano; E: extrato etanol; A: extrato aquoso

Com relação aos controles, nenhum apresentou contaminação, comprovando que todos os controles, ou seja, extratos, antifúngico, salina, DMSO a 1% e meio de cultura estavam livres de qualquer contaminação.

A Tabela 3 apresenta os resultados da CFM em Agar Sabouraud Dextrose (SDA) dos inóculos que tiveram seu crescimento inibido pela atividade dos extratos, assim como qual extrato demonstra melhor ação contra as cepas de leveduras. O melhor efeito observado, entre os três, foi do extrato etanol.

Tabela 3 - Concentração fungicida mínima dos inóculos em SDA ($\mu\text{g/mL}$)

Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Fruto Novo D	1000	*
Folhas E	1000	1000
Fruto Estoque E	*	1000
Fruto Novo E	1000	1000
Folhas A	*	500
Fruto Estoque A	*	*
Fruto Novo A	*	*
Nistatina	31,2	31,2

*: Valores de CIM maiores que $1000\mu\text{g/mL}$; D: extrato diclorometano; E: extrato etanol; A: extrato aquoso

Os controles salina, extratos, antifúngicos, DMSO a 1% e meio de cultura também foram plaqueados, confirmando que não estavam contaminados.

Diante desses resultados, para essa primeira triagem, podemos dizer que o extrato etanol Fruto Novo apresentou o resultado mais interessante, pois o extrato aquoso inibiu apenas uma cepa (*C. dubliniensis*), enquanto que o extrato etanólico continuou inibindo as cepas testadas e dados da literatura (Catão *et al.*, 2006; Fetrow & Avila, 2000; Gil *et al.*, 2000; Kulkarni & Aradhya, 2005) apontam o extrato do fruto com melhor atividade sobre as cepas de leveduras do que o extrato da folha, podendo-se, então, partir para um estudo mais detalhado e aprofundado desse extrato, buscando seus compostos ativos.

5.2 Cromatografia de Camada Delgada

Ao analisar a Cromatografia de Camada Delgada do extrato etanólico, em butanol/ ácido acético/ água 40/10/50% (Figura 5), foi observado a indicação de substâncias fenólicas, quando revelado com revelador NPEG, que, segundo a literatura, apresentam atividade antimicrobiana. A partir desse dado, foram realizados testes com extratos obtidos através da extração enzimática para verificar se as antocianinas presentes nessas substâncias fenólicas possuem substâncias que inibem o crescimento das leveduras.

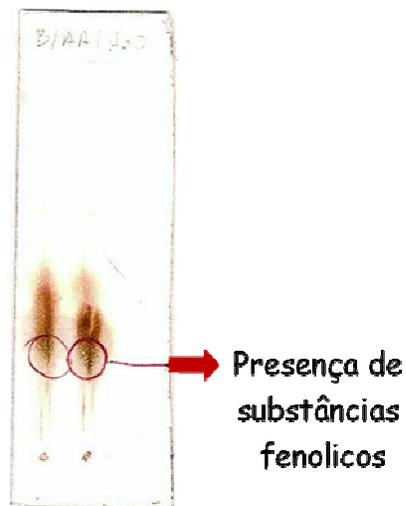


Figura 5 - Cromatografia de Camada Delgada do extrato Fruto Novo etanol, evidência de substâncias fenólicas.

5.3 Atividade antifúngica dos extratos obtidos através do processo enzimático com a enzima xilanase e branco

Extratos obtidos com a enzima xilanase são ricos em antocinidinas, compostos que apresentam propriedades antimicrobianas. Os resultados dos extratos Folha I Enzima, Folha I Branco, Folha II Enzima, Folha II Branco, Fruto I Enzima, Fruto I Branco, Fruto II Enzima, Fruto II Branco, EtOH Enzima, EtOH Branco, Suco Enzima e Suco Branco, após 24 horas, podem ser observados na Tabela 4, na qual observa-se que não há diferença evidente na atividade de inibição dos extratos obtidos com a enzima xilanase e sem a enzima (branco), com exceção dos extratos Fruto II Enzima, Fruto II Branco, Suco Branco e Suco Enzima, que não apresentaram atividade.

Tabela 4: Resultado da leitura visual (formação de depósitos/colônias no fundo do poço e/ou turvação) dos extratos Enzima e Branco, e do antifúngico ($\mu\text{g/mL}$) após 24h:

Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Folhas I E	500	500	NA
Folhas I B	500	500	NA
Folhas II E	1000	1000	NA
Folhas II B	1000	1000	NA
Fruto I E	1000	1000	NA
Fruto I B	1000	1000	NA
Fruto II E	*	*	NA
Fruto II B	*	*	NA
EtOH E	1000	1000	NA
EtOH B	1000	1000	NA
Suco E	*	NA	*
Suco B	*	NA	*
Nistatina	1,9	1,9	1,9

*: Valores de CIM maiores que $1000\mu\text{g/mL}$; NA: não avaliado; E: Enzima; B: Branco

A Tabela 5 mostra que após o período de 48 horas os extratos não tiveram efeito satisfatório, sendo que apenas os extratos Folhas II Branco, Fruto I Enzima e Branco, e EtOH Branco apresentaram atividade, com CIM de $1000\mu\text{g/mL}$, demonstrando, ainda, que os extratos obtidos com a enzima xilanase, na qual ocorre maior liberação de antocianinas, não tiveram eficácia na inibição do crescimento das leveduras testadas.

Tabela 5: Resultado da leitura visual (formação de depósitos/colônias no fundo do poço e/ou turvação) dos extratos Enzima e Branco, e do antifúngico ($\mu\text{g/mL}$) após 48h:

Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Folhas I E	*	*	NA
Folhas I B	*	*	NA
Folhas II E	*	*	NA
Folhas II B	1000	1000	NA
Fruto I E	1000	1000	NA
Fruto I B	*	1000	NA
Fruto II E	*	*	NA
Fruto II B	*	*	NA
EtOH E	*	*	NA
EtOH B	1000	1000	NA
Suco E	*	NA	*
Suco B	*	NA	*
Nistatina	3,9	3,9	1,9

*: Valores de CIM maiores que $1000\mu\text{g/mL}$; NA: não avaliado; E: Enzima; B: Branco

Com relação aos controles, observou-se que salina, extratos, antifúngico, DMSO a 1% e meio de cultura estavam livres de qualquer contaminação.

Os resultados obtidos através da concentração fungicida mínima dos inóculos, que tiveram seu crescimento inibido pelos extratos Folhas II Branco, Fruto I Enzima, Fruto I Branco e EtOH, revelou ação fungistática desses extratos, e a comprovação de não-contaminação dos controles negativos, contudo esses resultados demonstraram que os extratos obtidos com a enzima xilanase não são viáveis para a obtenção de compostos ativos.

5.4 Atividade antifúngica dos extratos arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro.

Os resultados da terceira triagem dos extratos da *Punica granatum*, arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro, estão demonstrados nas Tabelas 6 e 7. Na Tabela 6, com 24 horas de crescimento, observamos atividade dos extratos pericarpo, casca e fruto

inteiro, e resistência das dez cepas ao extrato arilos mais sementes. O extrato pericarpo apresentou CIM de 31,5µg/mL para a cepa *C. parapsilosis*, 62,5µg/mL para *C. utilis*, *C. lusitaniae* e *C. glabrata*, e com CIM de 125µg/mL e 250µg/mL para as demais cepas, demonstrando melhor atividade do que os outros extratos. O extrato casca apresentou o segundo melhor resultado, seguido do extrato fruto inteiro.

Tabela 6: Atividade antifúngica (CIM – µg/mL) dos extratos etanólicos da *P. granatum* (24h)

Microrganismos	Arilos + Sementes	Pericarpo	Casca	Fruto Inteiro	Nistatina
<i>C. albicans</i>	*	125	125	500	3,9
<i>C. dubliniensis</i>	*	125	250	250	3,9
<i>C. tropicalis</i>	*	250	250	500	1,9
<i>C. krusei</i>	*	125	125	250	3,9
<i>C. guilliermondii</i>	*	125	125	250	1,9
<i>C. utilis</i>	*	62,5	125	500	1,9
<i>C. parapsilosis</i>	*	31,5	125	125	3,9
<i>C. lusitaniae</i>	*	62,5	62,5	125	1,9
<i>C. glabrata</i>	*	62,5	125	250	3,9
<i>C. rugosa</i>	*	125	62,5	250	3,9

*: Valores de CIM maiores que 1000µg/mL

A Tabela 7, com 48 horas de leitura, revela que os extratos com melhor desempenho, isto é, que apresentaram atividade inibitória mais significativa, foram do pericarpo e da casca, com CIM de 125µg/mL, e resultados iguais para as mesmas cepas, com exceção da cepa *C. utilis*, que se mostrou um pouco mais resistente.

Tabela 7: Atividade antifúngica (CIM – µg/mL) dos extratos etanólicos da *P. granatum* (48h)

Microrganismos	Pericarpo	Casca	Fruto Inteiro	Nistatina
<i>C. albicans</i>	250	250	1.000	3,9
<i>C. dubliniensis</i>	250	250	500	3,9
<i>C. tropicalis</i>	250	250	500	1,9
<i>C. krusei</i>	125	125	250	3,9
<i>C. guilliermondii</i>	125	125	250	1,9
<i>C. utilis</i>	250	500	500	1,9
<i>C. parapsilosis</i>	125	125	250	3,9
<i>C. lusitaniae</i>	125	125	250	1,9
<i>C. glabrata</i>	250	250	500	3,9
<i>C. rugosa</i>	125	125	250	3,9

Ao inocular as cepas em meio Agar Sabouraud Dextrose direto da placa de 96 poços com os extratos, observou-se crescimento das leveduras, demonstrando que esses extratos

possuem efeito fungistático, enquanto que a nistatina teve efeito fungicida, pois nenhuma cepa cresceu ao ser inoculada no meio de cultura. Observou-se, também, que todos os controles negativos não apresentaram contaminação, e os controles positivos cresceram conforme o esperado.

5.5 Análise por Espectrometria de Massas das amostras arilos mais sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro.

Os resultados obtidos com as análises da Espectrometria de Massas das quatro amostras (Arilos mais Sementes, Pericarpo, Casca e Fruto Inteiro) da *Punica granatum* revelaram compostos com peso molecular (PM) e estruturas já identificados, através da comparação de dados da literatura (Lansky & Newman, 2007), e outros compostos não identificados, que variaram quanto a relação carga/massa entre os compostos, observando-se também suas semelhanças e diferenças.

Da amostra Arilos mais Sementes, apesar de não ter apresentado atividade inibitória contra nenhuma cepa de *Candida* spp., observamos na Figura 6, a detecção de mais de 20 compostos, sendo que aqueles com prevalência de mais de 40% foram agrupados na Tabela 8, e outros em menor quantidade, identificados como: melatonina (PM: 221 = 220 + H⁺), flavan-3-ol (PM: 249 = 226 + Na⁺), ácido elágico (PM: 325 = 302 + Na⁺), quercetina (PM: 325 = 302 + Na⁺), ácido clorogênico (PM: 365 = 342 + Na⁺; 381 = 342 + K⁺), sucrose (PM: 365 = 342 + Na⁺; 381 = 342 + K⁺) e pelargonidina 3,5-di-*O*-glicosídeo (PM: 595). O composto com PM de 219 teve detecção de 100%. Os compostos com PM 184 e 399 não foram identificados.

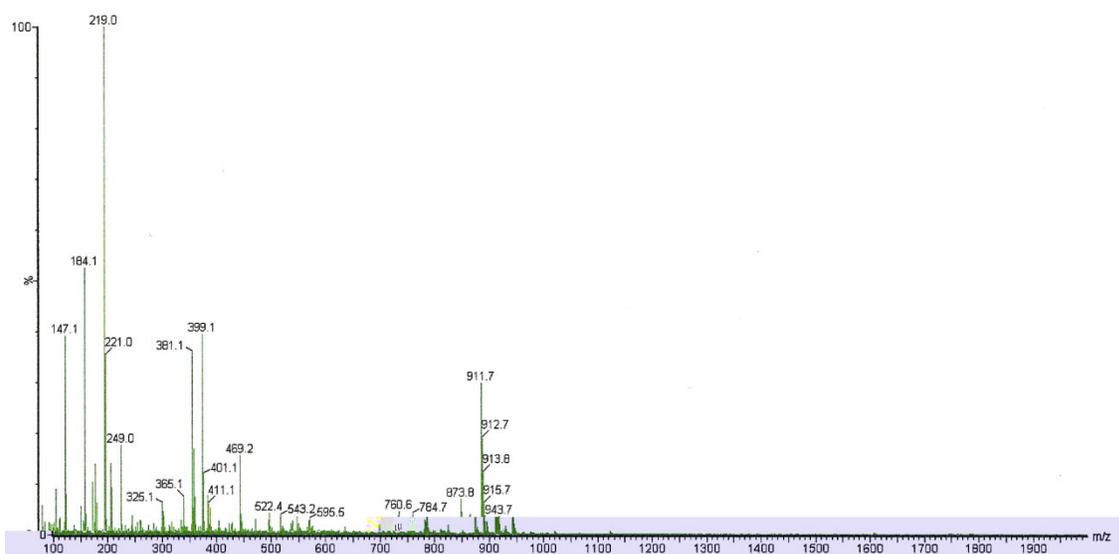
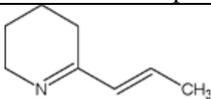
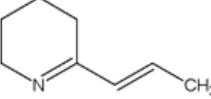
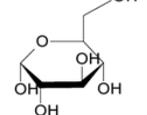
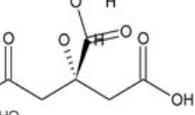
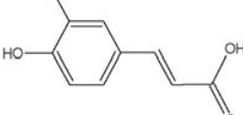


Figura 6: Monitoramento das classes químicas por ESI(+)-MS da amostra Arilos mais Sementes, obtido através do aparelho Q-Tof (Micromass - UK), feito no Laboratório Thomson, IQ-UNICAMP.

Tabela 8 – Peso Molecular, Classe Química, Nome do Composto e Estrutura do Composto detectados através da análise de Espectrometria de Massas (Lansky & Newman, 2007) da amostra Arilos mais Sementes.

Peso Molecular	Classe Química	Nome do Composto	Estrutura do Composto
147 = 124 + Na ⁺	Alcalóide piperidina	2-(2'-Propenil) Δ^1 -piperidina	
147 = 124 + Na ⁺	Alcalóide piperidina	Higrina	
219 = 180 + K ⁺	Açúcar simples	Glicose	
219 = 180 + K ⁺	Ácido orgânico alifático	Ácido cítrico	
219 = 180 + K ⁺	Ácido hidroxicinâmico (fenilpropanóide)	Ácido cafêico	

Na Figura 7, observa-se a detecção de mais de 20 compostos da amostra Fruto Inteiro, sendo que novamente o composto com PM de 219 teve detecção de 100%. Os

compostos com mais de 40% de prevalência foram identificados na Tabela 9, e outras substâncias em menor quantidade foram identificadas como: melatonina (PM: 221 = 220 + H⁺), testosterona (PM: 288 = 287 + H⁺), ácido púrico (PM: 316 = 277 + K⁺), ácido clorogênico (PM: 365 = 342 + Na⁺; 381 = 342 + K⁺), sucrose (PM: 365 = 342 + Na⁺; 381 = 342 + K⁺), pedunculagina (PM: 823 = 784 + K⁺) e telimagrandina (PM: 823 = 784 + K⁺).

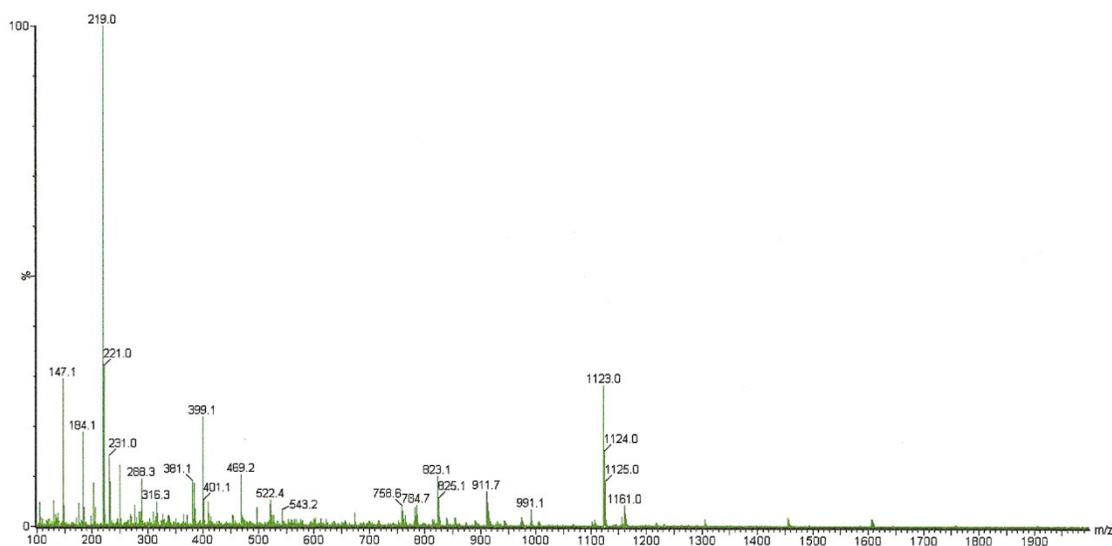
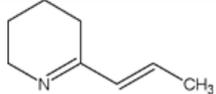
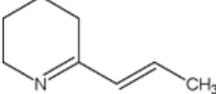
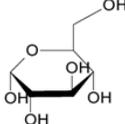
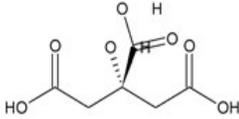
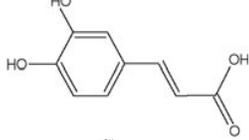
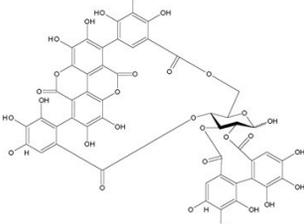


Figura 7: Monitoramento das classes químicas por ESI(+)-MS da amostra Fruto Inteiro, obtido através do aparelho Q-Tof (Micromass - UK), feito no Laboratório Thomson, IQ-UNICAMP.

Tabela 9 – Peso Molecular, Classe Química, Nome do Composto e Estrutura do Composto detectados através da análise de Espectrometria de Massas (Lansky & Newman, 2007) da amostra Fruto Inteiro.

Peso Molecular	Classe Química	Nome do Composto	Estrutura do Composto
147 = 124 + Na ⁺	Alcalóide piperidina	2-(2'-Propenil) Δ^1 -piperidina	
147 = 124 + Na ⁺	Alcalóide piperidina	Higrina	
219 = 180 + K ⁺	Açúcar simples	Glicose	
219 = 180 + K ⁺	Ácido orgânico alifático	Ácido cítrico	
219 = 180 + K ⁺	Ácido hidroxicinâmico (fenilpropanóide)	Ácido cafêico	
1123 = 1084 + K ⁺	Elagitanino	Punicalagina	

Da amostra Pericarpo, Figura 8, detectou-se mais de 30 compostos, sendo que aqueles que apresentaram mais de 40% de prevalência estão agrupados na Tabela 10, e os compostos identificados e em menor quantidade foram: melatonina (PM: 221 = 220 + H⁺), delphinidina 3-*O*-glicosídeo (PM: 465), sinapil 9-*O*-[β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*- β -D-glicopiranosídeo (PM: 521 = 520 + H⁺), rutina (PM: 635 = 612 + Na⁺), kaempferol 3-*O*-ramnoglicosídeo (PM: 635 = 596 + K⁺), punicacorteína A (PM: 635 = 634 + H⁺), punicacorteína B (PM: 635 = 634 + H⁺), coralagina (PM: 635 = 634 + H⁺), 1,2,4-tri-*O*-galoil- β -glicose (PM: 635), 1,3,4-tri-*O*-galoil- β -glicopiranosídeo (PM: 635), pedunculagina (PM: 823 = 784 + K⁺), telimagrandina (PM: 823 = 784 + K⁺), punigluconin 2,3-di-*O*-galloyl-4,6-(*S*)-hexahydroxydiphenoylgluconic acid (PM: 824 = 801 + Na⁺). Os compostos detectados apresentando prevalência de 100% foram 2-(2'-Propenil) Δ^1 -piperidina ou

higrina, e quase 100%, punicalagina. Os compostos com PM 621 e 725 não foram identificados.

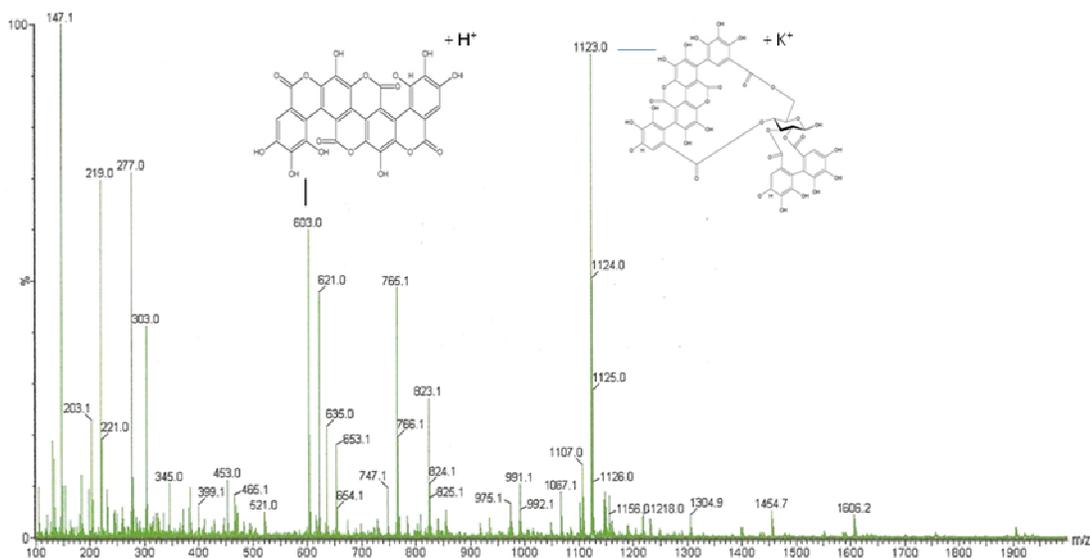
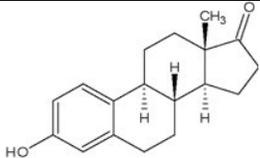
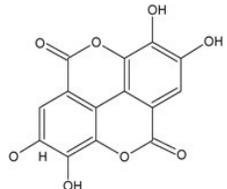
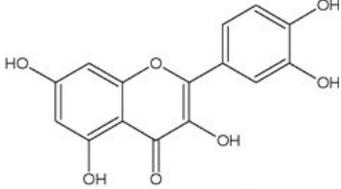
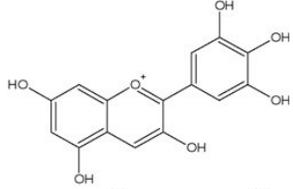
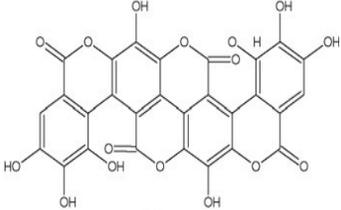
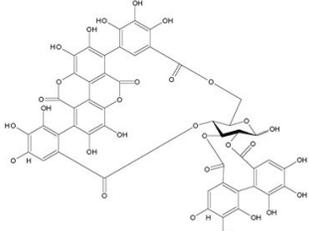


Figura 8: Monitoramento das classes químicas por ESI(+)-MS da amostra Pericarpo, obtido através do aparelho Q-Tof (Micromass - UK), feito no Laboratório Thomson, IQ-UNICAMP.

Tabela 10 – Peso Molecular, Classe Química, Nome do Composto e Estrutura do Composto detectados através da análise de Espectrometria de Massas (Lansky & Newman, 2007) da amostra Pericarpo.

Peso Molecular	Classe Química	Nome do Composto	Estrutura do Composto
147 = 124 + Na ⁺	Alcalóide piperidina	2-(2'-Propenil)Δ ¹ -piperidina	
147 = 124 + Na ⁺	Alcalóide piperidina	Higrina	
219 = 180 + K ⁺	Açúcar simples	Glicose	
219 = 180 + K ⁺	Ácido orgânico alifático	Ácido cítrico	
219 = 180 + K ⁺	Ácido hidroxicinâmico (fenilpropanóide)	Ácido cafêico	

Tabela 10 (continuação) – Peso Molecular, Classe Química, Nome do Composto e Estrutura do Composto detectados através da análise de Espectrometria de Massas (Lansky & Newman, 2007) da amostra Pericarpo.

Peso Molecular	Classe Química	Nome do Composto	Estrutura do Composto
277 = 254 + Na ⁺	Esteróide sexual	Estrona	
277 = 254 + Na ⁺	Ácidos graxos conjugados	Ácido púnico (<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13 octadecatrienoic acid)	
303 = 302 + H ⁺	Ácido hidroxibenzóico	Ácido elágico	
303 = 302 + H ⁺	Flavonóide	Quercetina	
303	Antocianidina	Delfinidina	
603 = 602 + H ⁺	Elagitanino	Galagildilactona	
1123 = 1084 + K ⁺	Elagitanino	Punicalagina	

A Figura 9 mostra a análise da amostra Casca, com mais de 30 substâncias detectadas, onde os compostos com mais de 40% de prevalência encontram-se na Tabela 11, sendo que a substância identificada como punicalagina apresentou 100% de detecção. Os outros compostos em menor quantidade foram: 2-(2'-Propenil) Δ^1 -piperidina (PM: 147 = 124 + Na⁺), higrina (PM: 147 = 124 + Na⁺), melatonina (PM: 221 = 220 + H⁺), estrona (PM: 277 = 254 + Na⁺); ácido clorogênico (PM: 381 = 342 + K⁺), sucrose (PM: 381 = 342 + K⁺), sinapil 9-*O*-[β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*- β -D-glicopiranosídeo (PM: 521 = 520 + H⁺), rutina (PM: 635 = 612 + Na⁺), kaempferol 3-*O*-ramnoglicosídeo (PM: 635 = 596 + K⁺), puniacorteína A (PM: 635 = 634 + H⁺), puniacorteína B (PM: 635 = 634 + H⁺), coralagina (PM: 635 = 634 + H⁺), 1,2,4-tri-*O*-galoil- β -glicose (PM: 635), 1,3,4-tri-*O*-galoil- β -glicopiranosídeo (PM: 635), puniacorteína A (PM: 673 = 634 + K⁺), puniacorteína B (PM: 673 = 634 + K⁺), coralagina (PM: 673 = 634 + K⁺).

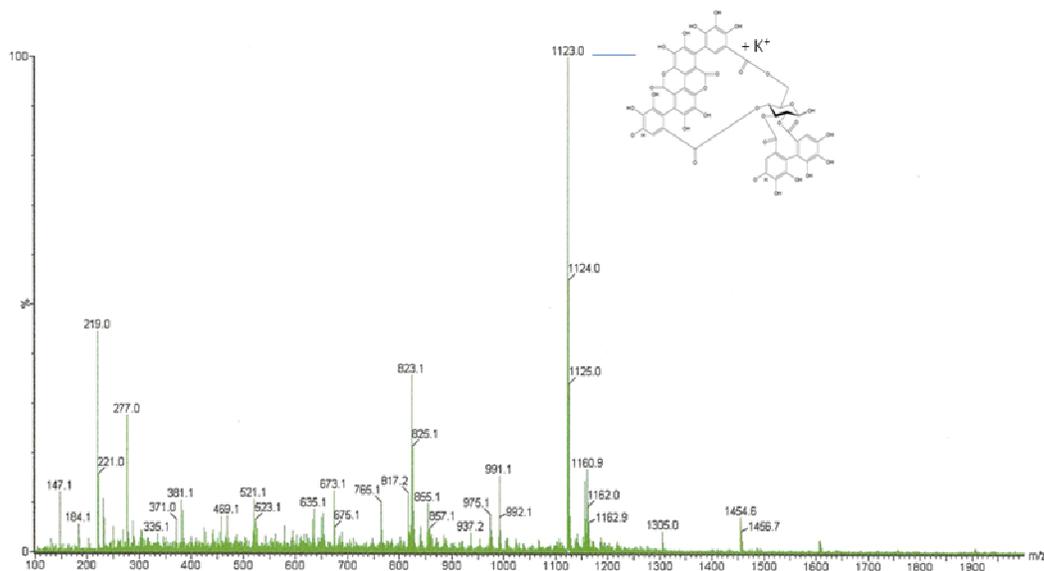
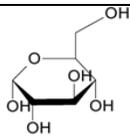
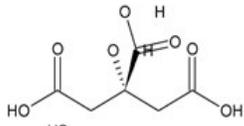
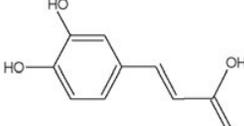
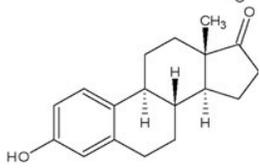
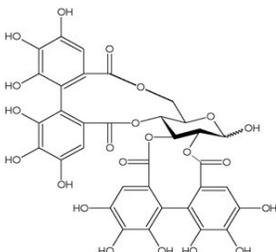
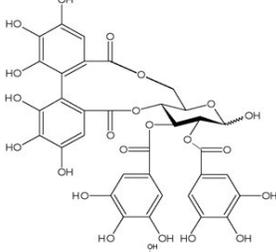
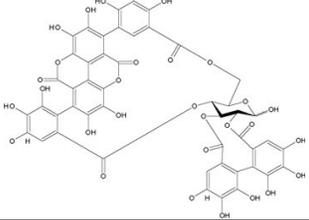


Figura 9: Monitoramento das classes químicas por ESI(+)-MS da amostra Casca, obtido através do aparelho Q-Tof (Micromass - UK), feito no Laboratório Thomson, IQ-UNICAMP.

Tabela 11 – Peso Molecular, Classe Química, Nome do Composto e Estrutura do Composto detectados através da análise de Espectrometria de Massas (Lansky & Newman, 2007) da amostra Casca.

Peso Molecular	Classe Química	Nome do Composto	Estrutura do Composto
219 = 180 + K ⁺	Açúcar simples	Glicose	
219 = 180 + K ⁺	Ácido orgânico alifático	Ácido cítrico	
219 = 180 + K ⁺	Ácido hidroxicinâmico (fenilpropanóide)	Ácido cafêico	
277 = 254 + Na ⁺	Esteróide sexual	Estrona	
277 = 254 + Na ⁺	Ácidos graxos conjugados	Ácido púnico (<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13 octadecatiênico acid)	
823 = 784 + K ⁺	Elagitanino	Pedunculagina	
823 = 784 + K ⁺	Elagitanino	Telimagrandina	
1123 = 1084 + K ⁺	Elagitanino	Punicalagina	

5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os resultados obtidos através dessa microscopia revelaram que, tanto o extrato do pericarpo quanto o extrato da casca da *Punica granatum*, modificam a morfologia das leveduras, pois as mesmas demonstraram alterações quando expostas a esses extratos, inibindo também o seu crescimento e provocando agregação entre as células, como pode ser observado nas Figuras 10a a 12n.

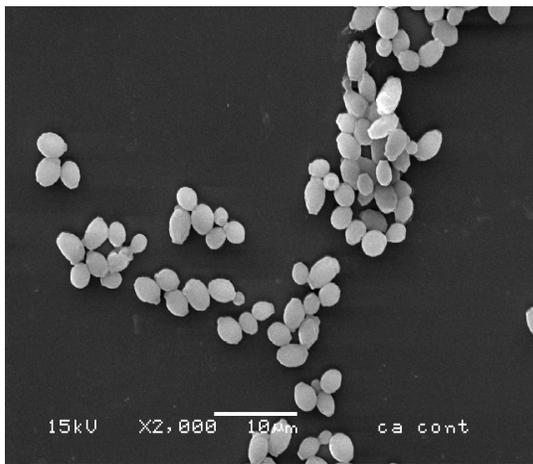


Figura 10a - *Candida albicans* CBS 562: controle. Observação de superfície lisa, homogênea e regular; células em formato oval, normais (MEV – aumento de 2000x).

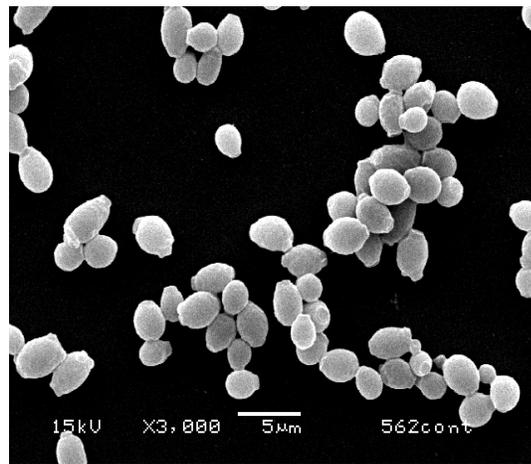


Figura 10b - *Candida albicans* CBS 562: controle. Observação de superfície lisa, homogênea e regular; células em formato oval, normais (MEV – aumento de 3000x).

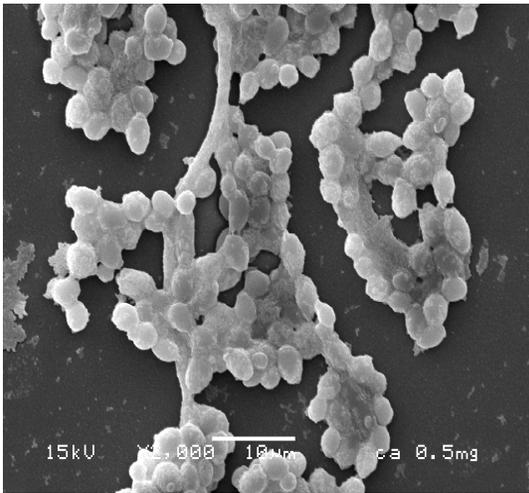


Figura 10c – Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *C. albicans* CBS 562. Superfície rugosa e irregular; células agregadas (MEV – aumento de 2000x).

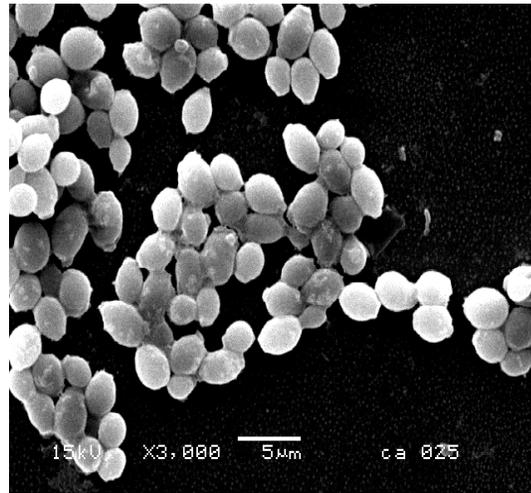


Figura 10d - Efeito do extrato pericarpo a 0,25mg/mL sobre *C. albicans* CBS 562. Superfície irregular das células leveduriformes (MEV – aumento de 3000x).

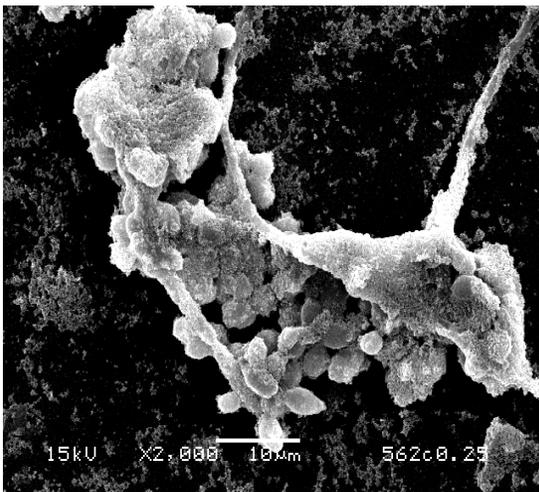


Figura 10e - Efeito do extrato casca a 0,25mg/mL sobre *C. albicans* CBS 562. Superfície rugosa e irregular; células agregadas; produção de material viscoso (MEV – aumento de 2000x).

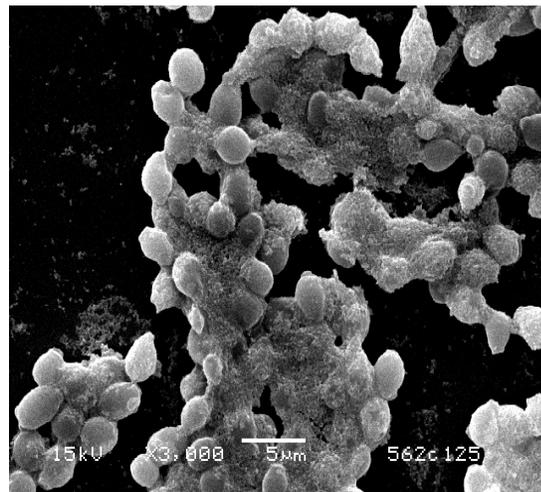


Figura 10f - Efeito do extrato casca a 0,125mg/mL sobre *C. albicans* CBS 562. Superfície rugosa e irregular; células agregadas; produção de material viscoso (MEV – aumento de 3000x).

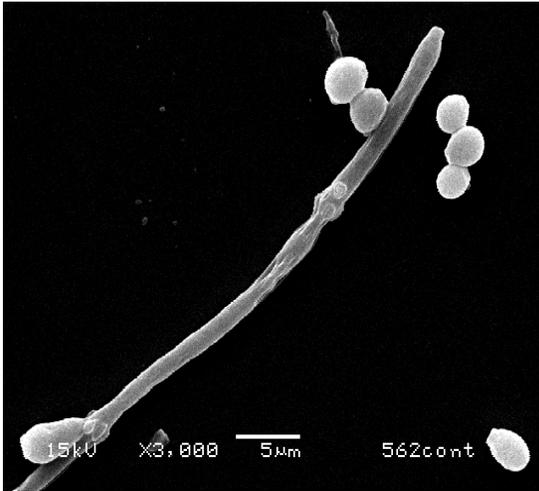


Figura 10g - *Candida albicans* CBS 562: hifa, controle. Superfície lisa e homogênea (MEV – aumento de 3000x).

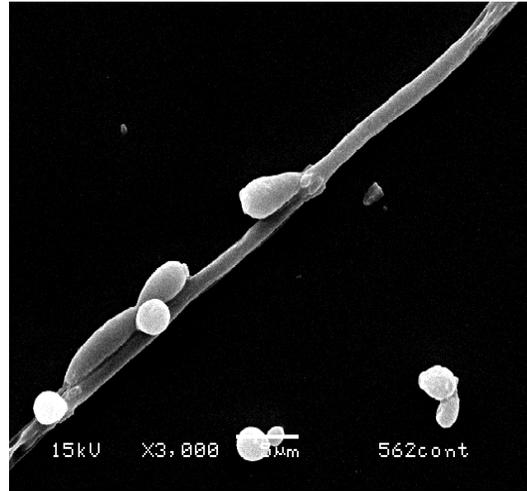


Figura 10h - *Candida albicans* CBS 562: hifa, controle. Superfície lisa e homogênea (MEV – aumento de 3000x).

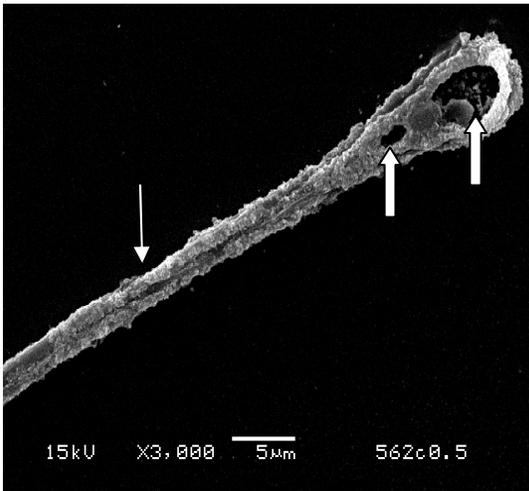


Figura 10i - Efeito do extrato casca a 0,5mg/mL sobre hifa de *C. albicans* CBS 562. Superfície rugosa, com descamação (seta fina) e formação de poros (seta larga). (MEV – aumento de 3000x).

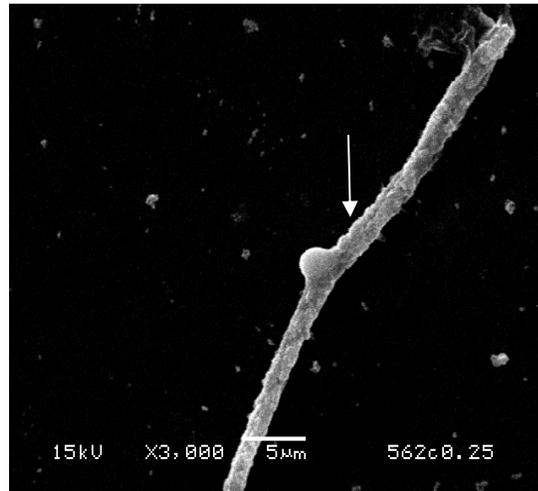


Figura 10j - Efeito do extrato casca a 0,25mg/mL sobre hifa de *C. albicans* CBS 562. Superfície rugosa, com descamação (seta fina) (MEV – aumento de 3000x).

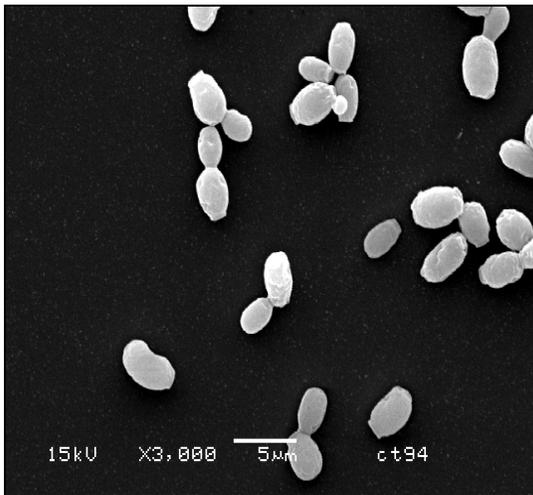


Figura 11a - *Candida tropicalis* CBS 94: controle. Observação de superfície lisa, homogênea e regular; células em formato oval, normais (MEV – aumento de 3000x).

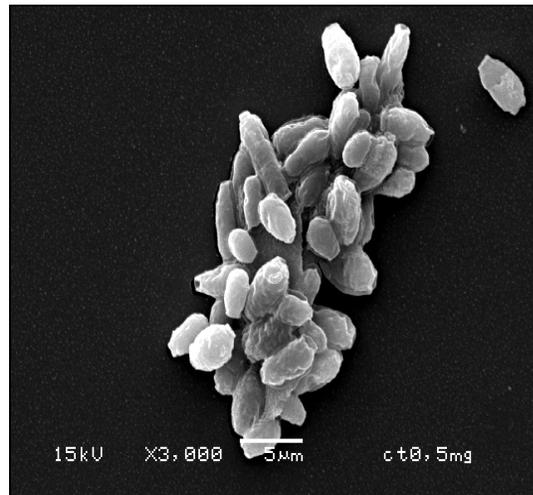


Figura 11b – Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *C. tropicalis* CBS 94. Superfície rugosa e irregular; células agregadas (MEV – aumento de 3000x).

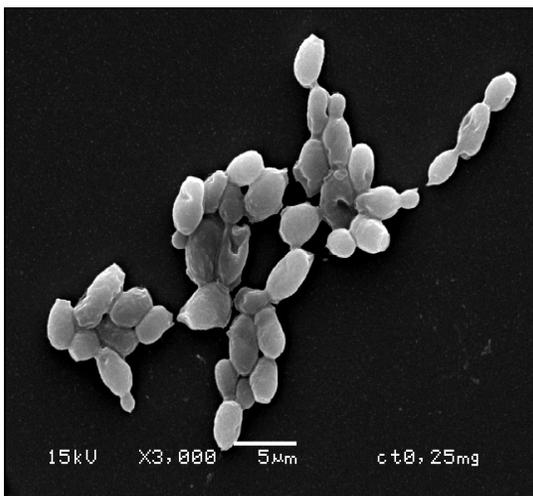


Figura 11c - Efeito do extrato pericarpo a 0,25mg/mL sobre *C. tropicalis* CBS 94. Superfície irregular (MEV – aumento de 3000x).

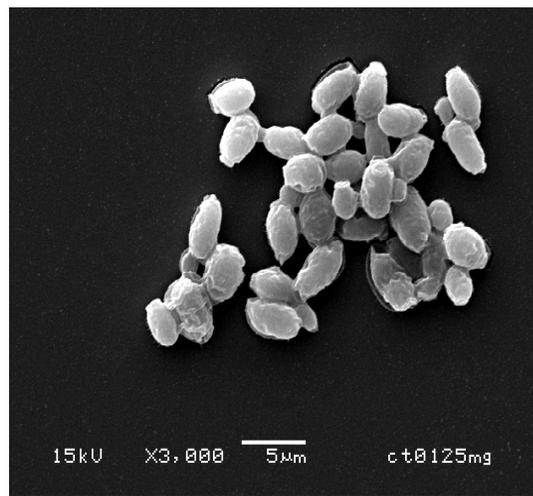


Figura 11d - Efeito do extrato pericarpo a 0,125mg/mL sobre *C. tropicalis* CBS 94. Superfície irregular (MEV – aumento de 3000x).

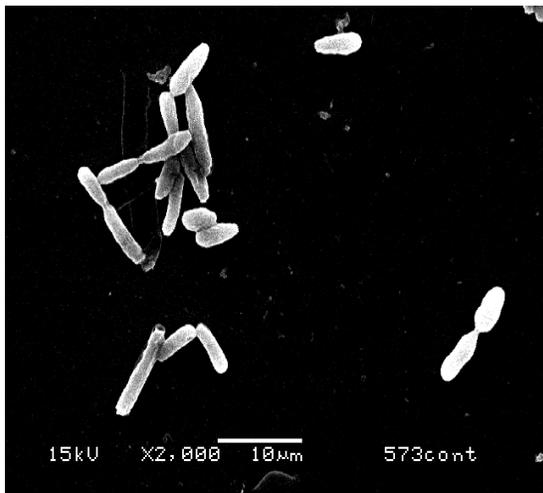


Figura 12a - *Candida krusei* CBS 573: controle. Observação de superfície lisa, homogênea e regular; células normais (MEV – aumento de 2000x).

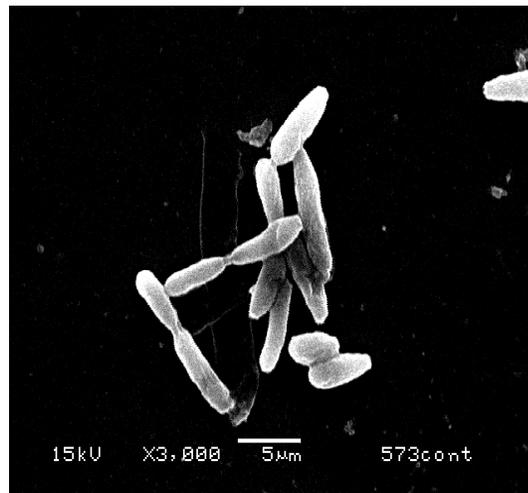


Figura 12b - *Candida krusei* CBS 573: controle. Observação de superfície lisa, homogênea e regular; células normais (MEV – aumento de 3000x).

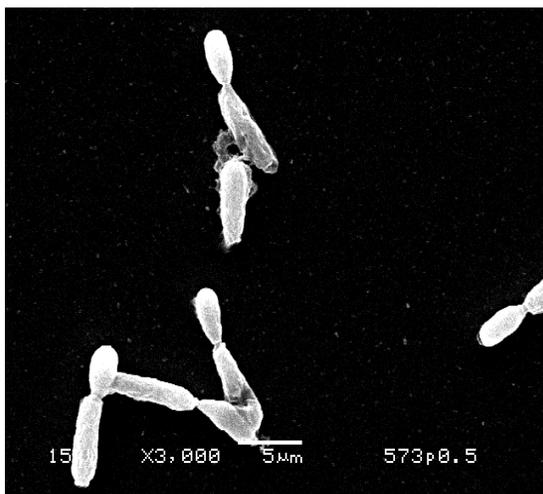


Figura 12c – Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *C. krusei* CBS 573. Superfície rugosa e irregular (MEV – aumento de 3000x).

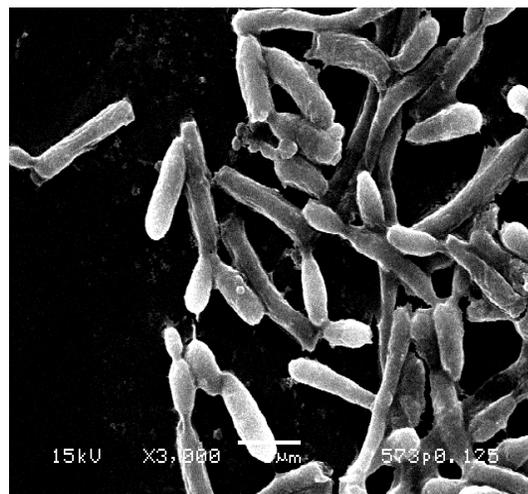


Figura 12d – Efeito do extrato pericarpo a 0,125mg/mL sobre *C. krusei* CBS 573. Superfície rugosa e irregular; células agregadas; células agregadas (MEV – aumento de 3000x).

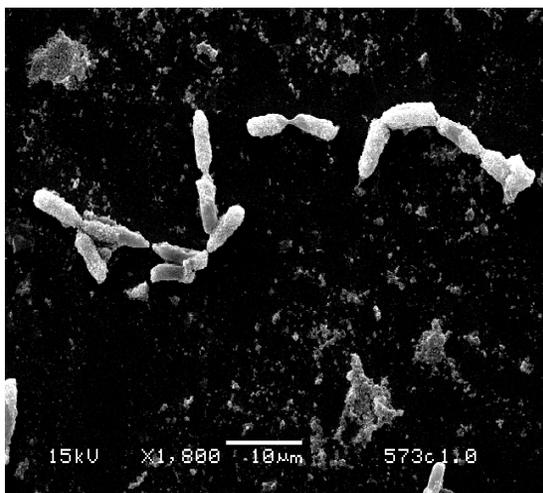


Figura 12e – Efeito do extrato casca a 1,0mg/mL sobre *C. krusei* CBS 573. Superfície rugosa e irregular (MEV – aumento de 1800x).

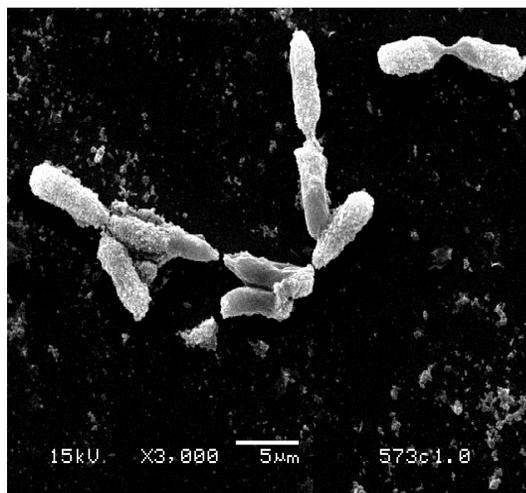


Figura 12f – Efeito do extrato casca a 1,0mg/mL sobre *C. krusei* CBS 573. Superfície rugosa e irregular (MEV – aumento de 3000x).

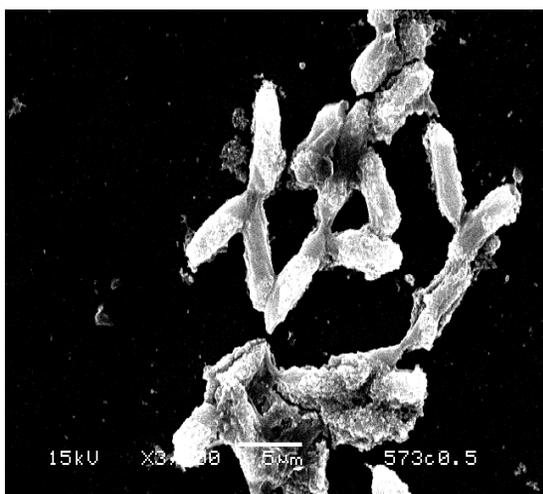


Figura 12g – Efeito do extrato casca a 0,5mg/mL sobre *C. krusei* CBS 573. Superfície rugosa e irregular; células agregadas; produção de material viscoso (MEV – aumento de 3000x).

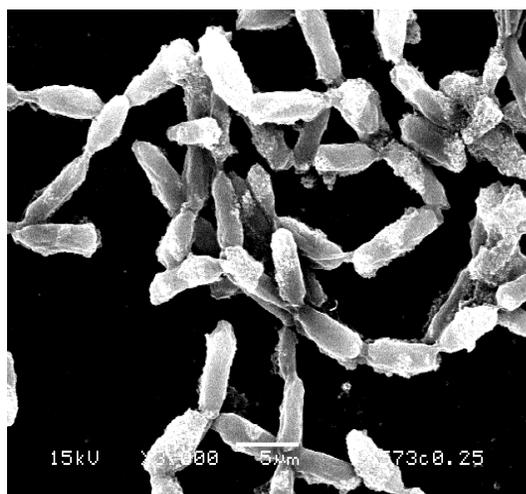


Figura 12h – Efeito do extrato casca a 0,25mg/mL sobre *C. krusei* CBS 573. Superfície rugosa e irregular; células agregadas; produção de material viscoso (MEV – aumento de 3000x).

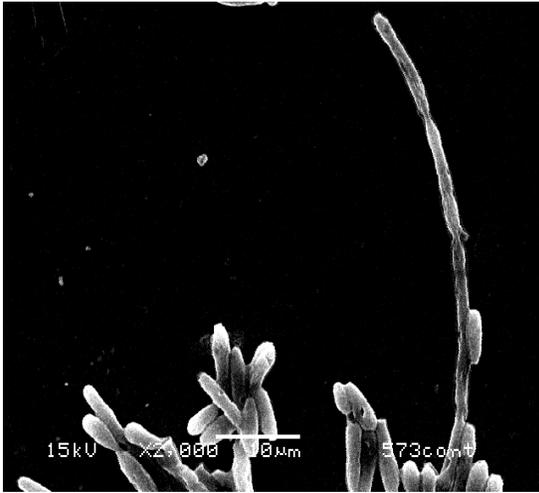


Figura 12i - *Candida krusei* CBS 573: hifa, controle. Superfície lisa e homogênea (MEV – aumento de 2000x).

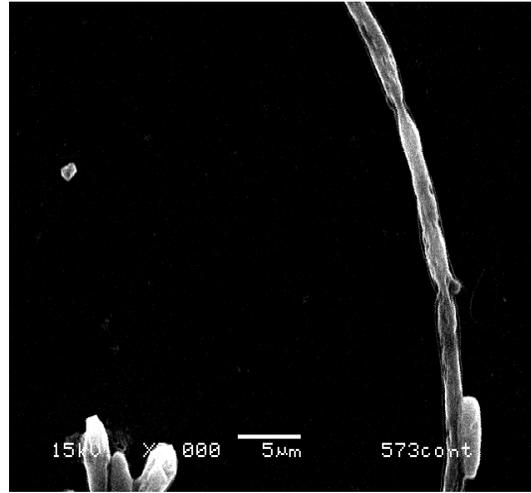


Figura 12j - *Candida krusei* CBS 573: hifa, controle. Superfície lisa e homogênea (MEV – aumento de 3000x).

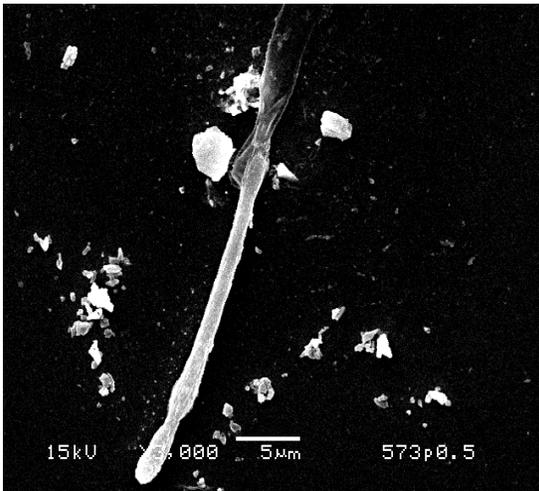


Figura 12k – Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre hifa de *C. krusei* CBS 573. Superfície irregular, hifa quebrada (MEV – aumento de 3000x).



Figura 12l – Efeito do extrato pericarpo a 0,25mg/mL sobre hifa de *C. krusei* CBS 573. Superfície irregular (MEV – aumento de 3000x).

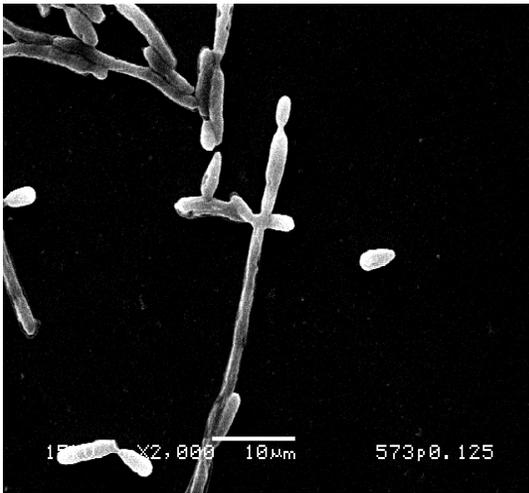


Figura 12m – Efeito do extrato pericarpo a 0,125mg/mL sobre hifa de *C. krusei* CBS 573. Superfície irregular (MEV – aumento de 2000x).



Figura 12n – Efeito do extrato pericarpo a 0,125mg/mL sobre hifa de *C. krusei* CBS 573. Superfície irregular (MEV – aumento de 3000x).

5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os resultados obtidos revelaram que os extratos do pericarpo e da casca da *Punica granatum* modificaram a estrutura das leveduras, promovendo alterações principalmente em sua parede celular, tornando-as mais espessas, e provocando formação de vacúolos, como pode ser observado nas Figuras 13a a 13j.



Figura 13a - *Candida albicans* CBS 562: controle. Células leveduriformes com parede celular e estruturas internas normais (MET – aumento de 7000x).

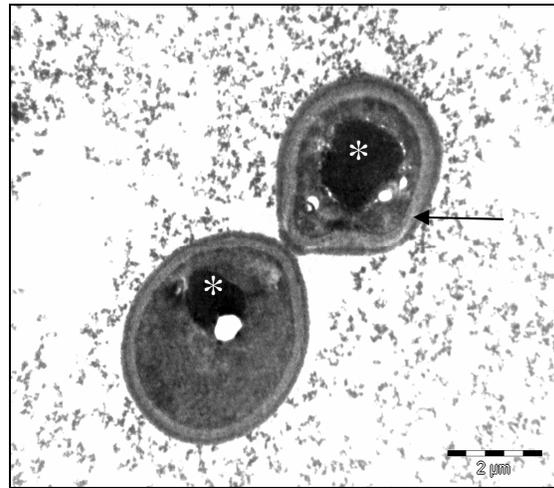


Figura 13b – Efeito do extrato pericarpo a 0,1mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Observação de parede celular espessa e irregular (seta) e formação de vacúolo (asterisco) (MET – aumento de 3000x).

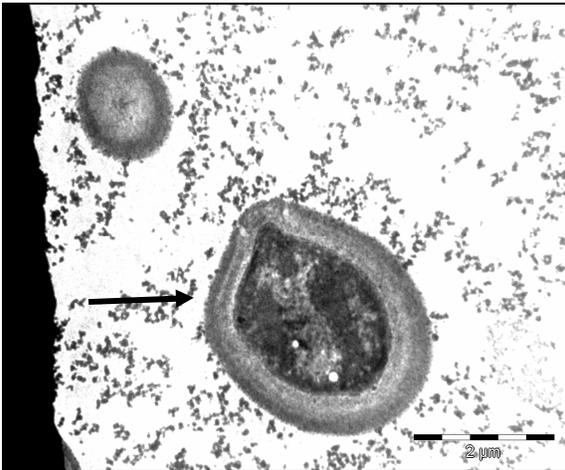


Figura 13c – Efeito do extrato pericarpo a 0,1mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Células leveduriformes com parede celular espessa e irregular (seta) (MET – aumento de 4400x).

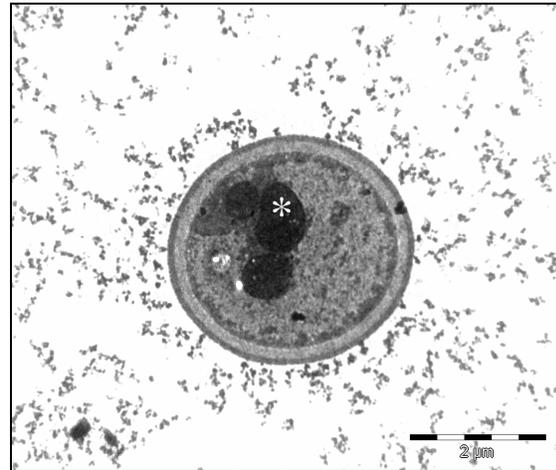


Figura 13d – Efeito do extrato pericarpo a 0,1mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Células leveduriformes com formação de vacúolo (asterisco) (MET – aumento de 4400x).

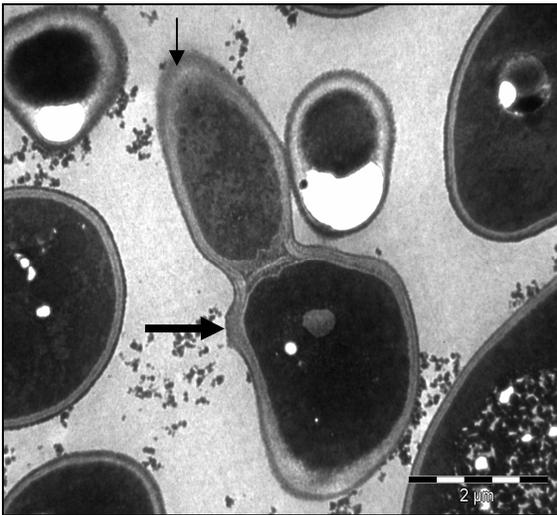


Figura 13e - Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Células leveduriformes com parede celular espessa e irregular (seta) (MET – aumento de 4400x).

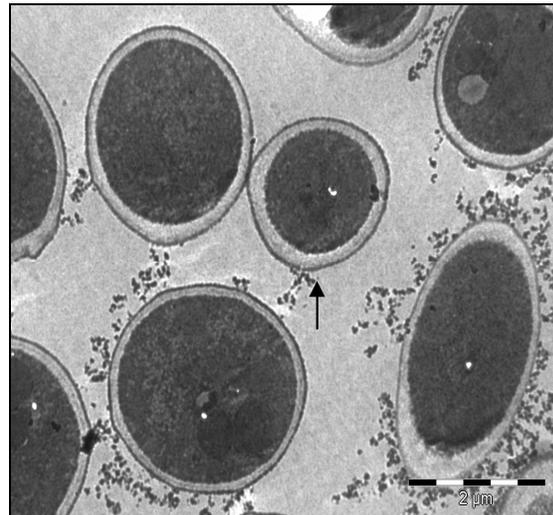


Figura 13f - Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Células leveduriformes com parede celular espessa e irregular (seta) (MET – aumento de 4400x).

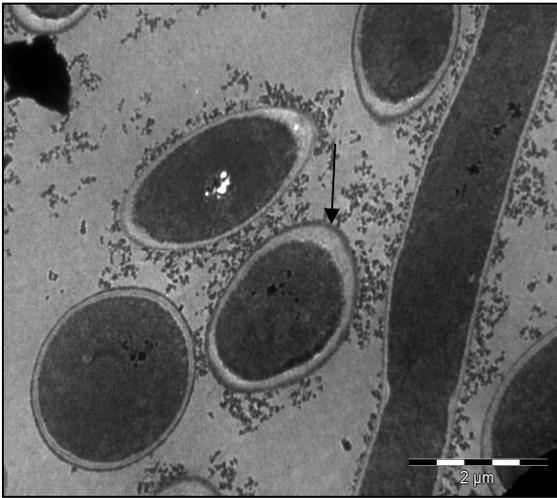


Figura 13g - Efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Parede celular espessa e irregular (seta) (MET – aumento de 4400x).

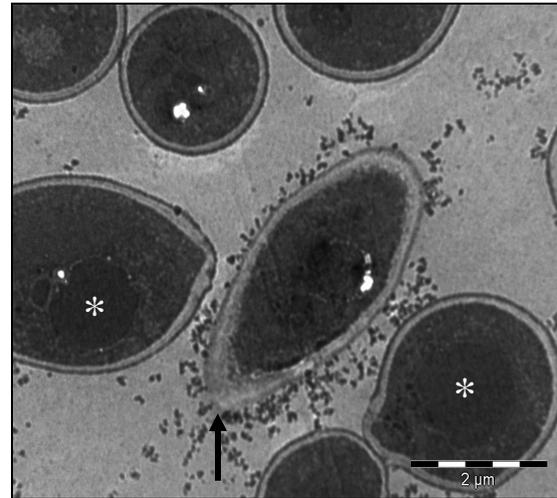


Figura 13h - efeito do extrato pericarpo a 0,5mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Parede celular espessa, irregular e estourada (seta), e formação de vacúolos (asterisco) (MET – aumento de 4400x).

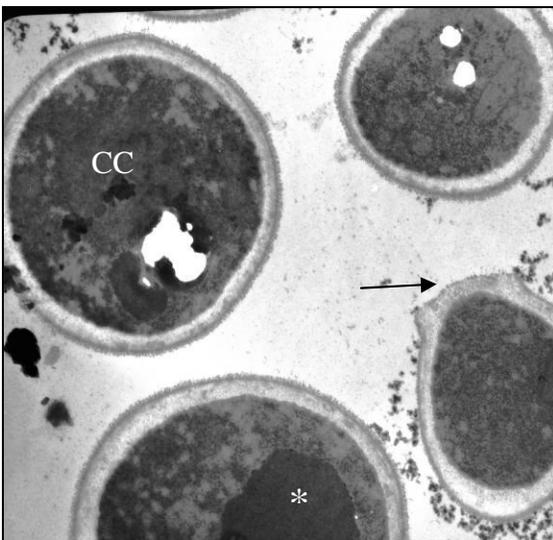


Figura 13i - Efeito do extrato casca a 0,5mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Parede celular espessa e má-formada (seta), formação de vacúolo (asterisco) e condensação da cromatina (CC) (MET – aumento de 12000x).

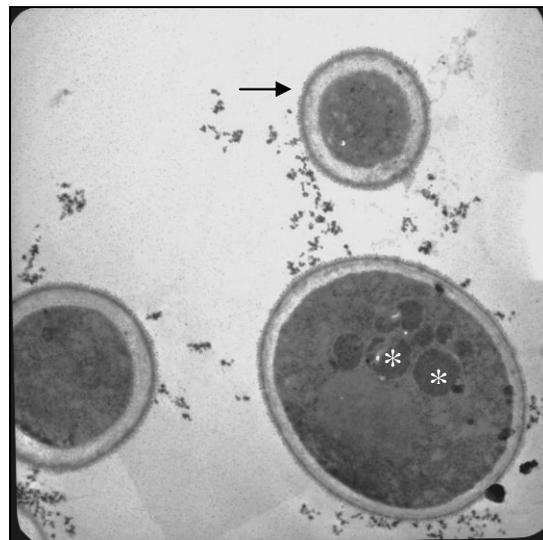


Figura 13j - Efeito do extrato casca a 0,5mg/mL sobre *Candida albicans* CBS 562. Parede celular espessa e tamanho menor da célula (seta), formação de vacúolos (asterisco) (MET – aumento de 12000x).

6. DISCUSSÃO

Diversos produtos naturais de plantas têm sido utilizados como estruturas básicas para síntese e desenvolvimento de novos medicamentos. Alguns produtos naturais que eram obtidos de plantas, como a cafeína, teofilina, efedrina, emitina, papaverina, ácido salicílico, etc, agora são produzidos comercialmente por síntese química. Outros produtos naturais obtidos de plantas servem como modelos químicos para a estrutura e a síntese de novos medicamentos. Exemplos como a beladona, quinina, cocaína, opiáceos, papaverina e ácido salicílico têm servido de modelos como estrutura e para síntese de drogas anticolinérgicas, anticolinesterases, antimalárica, benzocaína, procaína, lidocaína, aspirina, dentre outras (Van Geldre *et al.*, 1997). Alcalóides, como vimblastina e vincristina, isolados da planta *Catharanthus roseus* G. Don, originária de Madagascar, estão sendo utilizados para a inibição de células cancerígenas (Gueritte & Fahy, 2005).

Em muitos casos, os princípios ativos continuam sendo isolados das plantas, uma vez que sua síntese química é inviável técnica e economicamente, por exemplo, a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua* L. que é utilizada no tratamento da malária (Foglio, 1996; Van Geldre *et al.*, 1997). O valor dos produtos naturais das plantas medicinais para a sociedade e para a economia é incalculável. Cerca de 30% dos produtos vendidos nas farmácias são fabricados a partir de materiais extraídos de plantas ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais (Calixto, 1998). Diversos compostos antimicrobianos, como tigeiclina, telitromicina, micafungina e caspofungina, vem sendo obtidos de derivados de produtos naturais (Harvey, 2008). A atividade antifúngica das plantas vem sendo investigada em muitos estudos (Naqvi *et al.*, 1991; Souza, 1991; Anesini & Perez, 1993; Queiroz, 1998; Ali-Shtayeh & Abu Ghdeib, 1999).

Vários trabalhos já demonstraram, *in vitro*, sensibilidade de diversas bactérias e da levedura *C. albicans* ao extrato da *Punica granatum* Linné (Pereira, 1998; Queiroz, 1998). O fruto da romã contem uma alta proporção de compostos polifenólicos (delfinidina, cianidina e pelargonidina), sendo muito conhecido por seu uso terapêutico. O suco da romã possui atividade contra *S. aureus* metilina resistentes (Machado *et al.*, 2002) e contra o HIV (Lee & Watson, 1998), o vírus da herpes genital (Zhang *et al.*, 1995), reduz a pressão

sangüínea sistólica (Aviram & Dornfeld, 2001), e diminui a suscetibilidade de agregação e retenção do LDL (Aviram *et al.*, 2000).

Nesta pesquisa, os resultados da primeira triagem, com três diferentes solventes, possibilitou determinar qual extrato apresenta melhor desempenho contra as cepas de leveduras testadas (Tabelas 1, 2 e 3). O extrato Fruto Novo Diclorometano apresentou inibição do crescimento da *Candida albicans* e *C. dubliniensis*, porém, pelo CFM teve ação apenas sobre *C. albicans*. Os extratos aquosos inibiram as leveduras, com as menores concentrações (250µg/mL a 500µg/mL), mas pelo teste da concentração fungicida mínima, apenas o extrato Folhas teve efeito fungistático sobre *C. dubliniensis*. Os extratos Folha, Fruto Estoque e Fruto Novo Etanol inibiram o crescimento das leveduras com concentrações entre 500µg/mL a 1000µg/mL, com atividade fungicida, com exceção para Fruto Estoque x *C. albicans*.

Gil *et al.* (2000) demonstraram diferenças entre os componentes do suco fresco e do congelado da *P. granatum*, em que o suco congelado tinha seus compostos degradados, auxiliando, neste trabalho, a escolha do extrato, ou seja, descartando o extrato Fruto Estoque Etanol. Entre os extratos Folha e Fruto Novos, dados da literatura, como Fetrow & Avila, 2000; Gil *et al.*, 2000; Kulkarni & Aradhya, 2005; Lansky & Newman, 2007; Lansky *et al.*, 1998; Matos, 1989, apontam o extrato do fruto com mais atividade do que aqueles obtidos com a folha. Tais resultados permitiram definir qual tipo de extrato demonstra melhor atividade na inibição do crescimento das células leveduriformes, no caso, o extrato Fruto Novo Etanol.

Através da Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Figura 4), utilizando o revelador NPEG, foi possível detectar compostos fenólicos, e dentre esses compostos a presença de antocianinas, taninos hidrolisáveis, e ácido elágico e seus glicosídeos (Gil *et al.*, 2000). Os principais componentes do extrato dos frutos da *P. granatum* são taninos e polifenóis (Haslam, 1996; Pereira, 1998). Tem sido sugerido que o mecanismo de ação dos taninos esteja relacionado com a membrana celular, uma vez que esse componente pode precipitar proteínas (Nawwar *et al.*, 1994), inibindo também enzimas, como as glicosiltransferases em *Streptococcus mutans*, afetando sua habilidade em aderir à

superfície dental (Kakiuchi *et al.*, 1986). Portanto, polifenóis certamente interferem com as proteínas da saliva e algumas enzimas de bactérias orais. Assim, esses compostos podem afetar as membranas de bactérias e causar distúrbios na co-agregação bacteriana (Vasconcelos *et al.*, 2003). O principal emprego biológico atribuído às antocianinas é a sua atividade antioxidante (Seeram & Nair, 2002; Sun *et al.*, 2002; Meyers *et al.*, 2003).

Howell (2002) e Duman *et al.* (2009) relatam relação entre antocianinas e atividade antimicrobiana dos extratos de frutas cranberry e da *Punica granatum*, respectivamente. Com estes dados, e partindo de estudos prévios realizados no CPQBA por Taffarello (2008), a investigação de extratos contendo antocianinas para o teste de concentração inibitória mínima contra as leveduras deste trabalho foi alvo de interesse. Estudos de Taffarello (2008) detectaram que o tratamento enzimático das folhas de *Arrabidaea chica* forneceu extratos enriquecidos em antocianidinas, enquanto que os extratos obtidos sem tratamento enzimático apresentaram maior teor de antocianosídeos (compostos glicosilados), evidenciando que as xilanases promoveram hidrólise enzimática, liberando as agliconas, demonstrando sua atividade anticâncer e antioxidante *in vitro*. Esses dados serviram de base na investigação dessa classe de compostos, na procura de substâncias que apresentem ação antifúngica contra células leveduriformes do gênero *Candida*

As antocianinas são metabólitos pertencentes à classe dos flavonóides (Walton *et al.*, 2006), largamente encontradas na natureza e responsáveis pela maioria das colorações azuis, violeta e vermelho das flores e frutos, sendo utilizadas na indústria como corante natural (Markakis, 1982; Wrolstad, 2000; Malacrida & Motta, 2005). A sua estrutura química é formada por três anéis, que possuem ligações duplas conjugadas e também hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura que possibilitam o seqüestro de radicais livres, causadores de danos celulares e doenças degenerativas (Kong *et al.*, 2003b; Silva *et al.*, 2007). Diversos ensaios tem sido desenvolvidos para a avaliação desta atividade em diferentes vegetais, principalmente frutos e flores (Aaby *et al.*, 2005; Walton *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos dos extratos com e sem o tratamento enzimático demonstram baixa atividade, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5. Nas primeiras 24h, os extratos

da Folha demonstraram atividade nas concentrações entre 500µg/mL a 1000µg/mL e, posteriormente, com 48h apenas o extrato Folha II Branco mostra atividade. Dentre os extratos do Fruto, apenas os extratos Fruto I Enzima e Fruto I Branco inibiram o crescimento das leveduras na concentração de 1000µg/mL com 24h, sendo que *C. albicans* demonstrou resistência ao extrato Fruto I Branco com 48h. Os extratos EtOH com e sem tratamento com a enzima xilanase apresentaram atividade, na maior concentração (1000µg/mL), sendo que com 48h apenas o extrato Branco apresentou atividade. Os extratos do Suco não tiveram nenhuma atividade contra as leveduras testadas. Esses dados sugerem que outras alternativas de obtenção dos extratos devem ser testadas.

Dos extratos da segunda triagem, que apresentam atividade contra as leveduras, o teste da CFM das amostras revelou efeito fungistático. Deste modo, não houve diferença da atividade entre os extratos obtidos pelo processo de fermentação com a enzima xilanase do *B. pumilus* e sem a enzima, pois, além de alguns extratos não apresentarem atividade, outros tiveram uma CIM elevada, com valores pouco favoráveis para uma investigação mais aprofundada dos compostos presentes nesses extratos. Esses resultados sugerem que o foco das pesquisas nessa linha de investigação devem se basear na metodologia da extração simples, na procura de outros compostos fenólicos, com potencial de atividade antimicrobiana.

A terceira triagem revelou efetividade dos extratos da casca, do pericarpo e do fruto inteiro, com exceção do extrato arilo mais sementes, em que as dez cepas de leveduras testadas foram resistentes, não apresentando sensibilidade nem na mais alta concentração (1000µg/mL). No entanto, mostraram-se sensíveis aos outros três tipos de extratos, sendo que os extratos obtidos do pericarpo e da casca apresentaram os melhores desempenhos, com CIM de 125µg/mL para as leveduras *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. rugosa*, mas com maiores concentrações para as demais cepas. O extrato fruto inteiro também inibiu o crescimento das leveduras, mas não na mesma proporção. Esses resultados indicam que, possivelmente, a atividade da *P. granatum* encontra-se presente no pericarpo e na casca dessa fruta. Embora o CFM das amostras revelasse ação fungistática, os valores da CIM são promissores, indicando que a metodologia utilizada se

mostra mais adequada, sugerindo maiores investigações dos compostos que apresentam atividade, presentes nos extratos obtidos do pericarpo e casca da *Punica granatum*.

Outros trabalhos também demonstram o uso e a efetividade do extrato polar da *Punica granatum* contra microrganismos. Estudos de Voravuthikunchai *et al.* (2004) demonstraram inibição de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica na presença de 0,5-3mg/mL (CIM) do extrato etanólico da casca da romã. A CIM variou entre 0,39 a 25mg/mL contra várias cepas de *E. coli* (Prashanth *et al.*, 2001; Voravuthikunchai *et al.*, 2004). De acordo com Menezes *et al.* (2006), o extrato hidroalcolólico da *Punica granatum* diminuiu o número de unidades formadoras de colônia da placa dental bacteriana em 84%, comparado a clorexidina (79% de inibição). Ambos, extrato e clorexidina, foram efetivos contra espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella* e *Proteus*, assim como *E. coli*. Os dados obtidos em nosso trabalho corroboram com os resultados desses autores, onde os extratos polares tiveram melhor ação antimicrobiana.

Diferentes perfis inibitórios do extrato da casca contra microrganismos podem ser, em parte, devido às diferentes metodologias de extração, amadurecimento da fruta usada e variações do tempo e região de cultivo (McCarrel *et al.*, 2008). Schwartz *et al.* (2009) compararam frutos da romã, seus compostos e atividades, de duas regiões diferentes de Israel: Newe Ya'ar (clima Mediterrâneo) e Arava (clima desértico). Os frutos de Newe Ya'ar, cultivados em região de baixas temperaturas, apresentaram altos níveis de antioxidantes e compostos fenólicos totais, comparado com os frutos de Arava, durante o período de maturação.

Estudos de Celik *et al.* (2008) acompanharam o desenvolvimento dos estágios de amadurecimento das frutas cranberry, desde seu estágio mais imaturo até sua maturação total, observando e comparando sua quantidade de compostos fenólicos totais e de antocianinas. Durante sua maturação, os níveis de compostos fenólicos totais decresceu, de 7990mg para 4745mg EAG (equivalente ácido gálico)/kg, e de antocianinas aumentaram de 0,8mg para 111,0mg/kg, demonstrando, com isso, que os estágios de desenvolvimento da planta interferem com seus compostos antioxidantes, visto que no estágio mais imaturo havia elevada capacidade antioxidante dessa fruta. Esses dados corroboram com nossos

resultados, em que os frutos da romã apresentaram atividade antifúngica melhor dos frutos imaturos, no caso os Frutos I. Os Frutos I e II estavam em diferentes estágios de maturação, sendo que os Frutos I encontravam-se mais verdes, e os Frutos II mais maduros, o que pode ter causado a diferença de atividade entre esses frutos. A maturidade em que a planta se encontra sugere ser um importante fator para a produção e/ou obtenção de compostos com princípios ativos, com potencial antimicrobiano.

Gil *et al.* (2000) observaram que, tanto o suco comercial quanto o obtido no laboratório, tinham os mesmos pigmentos de antocianinas, mas com significantes diferenças quantitativas, porém, quando a fruta era congelada e guardada antes da extração do suco, as antocianinas eram parcialmente degradadas e/ou transformadas em outros produtos. Algo similar foi observado nas antocianinas obtidas do suco comercial concentrado. Deste modo, pode-se observar que o armazenamento tem também influência na atividade das propriedades dos compostos das plantas, sendo um fator importante a se considerar para a obtenção dos extratos.

O extrato Fruto Estoque, desta pesquisa, demonstrou atividade semelhante ao Fruto Novo, porém observou-se um melhor resultado contra as leveduras do extrato Fruto Novo, concordando com Gil *et al.* ao comparar fruto fresco e congelado, distinguindo essa diferença, já que esse é um aspecto importante a se considerar, pois trabalhos que requerem antocianinas íntegras devem avaliar essa possibilidade de degradação para que não ajam interferências nos resultados.

Variações nos resultados entre estudos com os extratos da romã tem sido observados em análises por difusão em disco e nas determinações da concentração inibitória mínima. Valores da CIM tem sido reportado em um grande número de estudos, variando entre 0,62mg/mL a 10mg/mL contra *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Navarro *et al.*, 1996) e acima de 250mg/L contra *S. aureus* para extratos polares e apolares (Machado *et al.*, 2003). Essas diferenças podem estar relacionadas com o método de extração, como o uso de frutos mais frescos, e variações de estação e região da coleta (McCarrel *et al.*, 2008), como observado anteriormente. Segundo Al-Zoreky (2009), diferenças na atividade dos extratos da casca da romã entre vários períodos do estudo podem ser, parcialmente,

explicados pela variação dos compostos fenólicos dos extratos, sensibilidade das cepas e procedimentos antimicrobianos utilizados nos testes.

Ainda, de acordo com Mason & Wasserman (1987), o potencial de atividade antibacteriana dos compostos puros de plantas pode ser explicada com base em sua estrutura fenólica. Os mecanismos considerados responsáveis pela toxicidade fenólica aos microrganismos incluem inibição enzimática pela oxidação dos compostos, possivelmente através da reação com grupos sulfidril ou por interações com proteínas, permitindo inativação da proteína e perda de função. Prováveis alvos da célula microbiana são polipeptídeos da parede celular e ligação das enzimas à membrana (Stern *et al.*, 1996).

Dentre os compostos analisados com as quatro amostras da *Punica granatum*, detectou-se a presença de substâncias semelhantes nessas amostras, como a melatonina e açúcar simples. Os compostos com PM de 219 parecem não exercer atividade contra as leveduras, ou se exercem, em níveis muito baixos, uma vez que, presente 100% nos Arilos mais Sementes, este extrato não apresentou ação contra as cepas testadas, e o extrato do Fruto Inteiro inibiu as cepas, mas com CIM mais elevada.

As amostras dos extratos do Pericarpo e da Casca, que apresentaram melhor atividade contra as espécies de *Candida* spp., tiveram como diferencial, a presença do tanino punicalagina em uma concentração bastante elevada, além de outros taninos, como pedunculagina e telamagrandina. A amostra do Pericarpo apresentou, ainda, o tanino galagildilactona, substância não detectada – ao menos não em grande quantidade – nesse espectro nas outras amostras. Esses taninos podem ser os principais responsáveis pelo potencial antifúngico dos extratos Pericarpo e Casca da *P. granatum*, objetivo de pesquisas futuras. Portanto, sugere-se que os compostos punicalagina e galagildilactona sejam um dos principais compostos envolvidos na atividade antifúngica observada nos extratos da *Punica granatum*. A possibilidade, ainda, de ocorrer um sinergismo entre os compostos é um fato que não pode ser descartado, visto que várias substâncias, como açúcar simples e ácidos graxos conjugados estão presentes em grande quantidade.

Estes dados corroboram observações de Vasconcelos *et al.* (2003), Menezes *et al.* (2006), Catão *et al.* (2006) e Fetrow & Avila (2000). Vasconcelos *et al.* (2003) atribui aos

taninos, identificados nos extratos de *P. granatum*, a ação de inibição do crescimento de leveduras da espécie *Candida* spp, pois agem nas células, mais especificamente na membrana celular, por precipitação de proteínas. Também sugeriu que o extrato dessa planta inibe várias enzimas de *S. mutans*, afetando sua habilidade de aderir na superfície dental. Segundo Menezes *et al.* (2006), o composto elagitanina, fração punicalagina, é tido como a fração responsável pela atividade antibacteriana da romã. Catão *et al.* (2006) e Fetrow & Avila (2000), indicam que os taninos, como punicalina, punicalagina, galagildilactona, pedunculagina, telimagrandina I e corilagina, possuem atividade antimicrobiana.

Resultados dos trabalhos de Aviram *et al.* (2008) demonstraram que o extrato da casca da romã teve efeito antioxidante muito mais potente do que aquele obtido com os arilos, indicando que os compostos polifenólicos da casca são os principais contribuintes para capacidade antioxidante do suco da romã, como já descrito por Li *et al.* (2006), Ricci *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2007), corroborando com os nossos resultados, em que o extrato da casca apresentou efeito contra as leveduras do gênero *Candida*, enquanto o extrato dos arilos não teve nenhuma atividade contra as mesmas cepas testadas.

De acordo com Toumy & Rauwala (2002), muitos compostos tem sido isolados da *P. granatum*, incluindo elagitaninos e taninos (punicalina, punicalagina e 2-O-galoilpunicalina). Machado *et al.* (2003) relatam maior inibição da fração PG_{F1}, que é rica em elagitaninos (62,5mg/L), contra cepas de *S. aureus* metilicina-resistentes. A presença de flavonóides e taninos em plantas da família Punicaceae pode ser responsável por diversas atividades biológicas, como descrito por Hussein *et al.* (1997). Os dados obtidos em nossa pesquisa com *P. granatum*, contribuem para aumentar o entendimento nessas questões em relação aos compostos bioativos.

Como observado nos resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura, pôde-se constatar que os extratos pericarpo e casca produziram alterações na morfologia das leveduras testadas, além de agregação celular e inibição do seu crescimento (Figuras 10a a 12n). Ao comparar com as amostras controle, observa-se que as mesmas tem uma aparência lisa, homogênea e regular, com a presença de brotos, tanto das células (Figuras

10a, 10b, 11a, 12a e 12b) quanto das hifas (Figuras 10g, 10h, 12i e 12j), sendo que as amostras com o extrato encontram-se com a parede rugosa, irregular, com um agregado recobrimdo sua superfície, algumas com presença de poros, e hifas com aparência de descamação, resultantes da ação dos extratos.

Angiolella *et al.* (2008) observaram que, em *Candida albicans* resistente ao fluconazol e micafungina, havia maior propensão para a formação de biofilme. As Figuras 9c (*C. albicans* mais extrato pericarpo a 0,5mg/mL), 9e (*C. albicans* mais extrato casca a 0,25mg/mL) e 9f (*C. albicans* mais extrato pericarpo a 0,125mg/mL) demonstram um aglomerado de células e a presença de produtos oriundos do processo de degeneração das leveduras. No entanto, a formação de biofilme como uma estrutura biológica ativa, parece remota, já que as células demonstram alterações visíveis de degeneração, impedindo-as de exercerem a sua atividade fisiológica normal.

Os resultados obtidos através da microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que os extratos interferem nas estruturas das leveduras, causando alterações em sua parede celular, tornando-as mais espessas, com má-formação e aumentando a presença de vacúolos, indicando que os extratos provocam sérios danos nas estruturas das células leveduriformes, sugerindo que os compostos fenólicos, no caso, taninos, podem ser os responsáveis pelas alterações, exercendo sua atividade na parede celular, precipitando proteínas.

O extrato da casca demonstra ter provocado danos mais severos às leveduras das espécies *C. albicans* e *C. krusei* do que o extrato do pericarpo, como pode-se observar através das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. No entanto, dados mais complementares podem ainda ser obtidos para que se possa ampliar o conhecimento sobre a ação local desses compostos nos microrganismos.

Um primeiro passo para a descoberta de novos fármacos é identificar e validar alvos moleculares específicos. Com a expansão do conhecimento da bioquímica e genética microbiana, agora é possível identificar importantes enzimas microbianas, receptores e processos a níveis moleculares que podem ser alvos para a ação da droga. Compostos que bloqueiem o funcionamento desses alvos e que possam inibir o crescimento microbiano

podem ser identificados. Vários alvos já foram, de fato, identificados e novos estão sendo descobertos. Pesquisas do genoma e proteoma microbiano possibilitam um avanço mais rápido entre as informações estruturais microbianas e interação da droga, criadas através de programas computacionais (Kitchen *et al.*, 2004). Essa linha de investigação deverá ser alvo de pesquisas futuras em nossos laboratórios.

Os dados obtidos em nossa pesquisa com substâncias da *Punica granatum* demonstram capacidade antimicrobiana contra células leveduriformes do gênero *Candida*. Os componentes bioativos (taninos) presentes no pericarpo e na casca demonstram atividade antifúngica. Os compostos dessa família de substâncias podem estar envolvidos na ação antifúngica detectados por espectrometria de massas. Esses compostos bioativos sugerem ser os responsáveis por alterações na morfologia celular desses microrganismos, com inibição do crescimento e agregação celular. Esses dados abrem perspectivas futuras de pesquisas dando continuidade à essa linha de investigação, onde informações como local de ação dos compostos e, até mesmo o composto responsável pela atividade, possam contribuir para a terapia alternativa contra esses organismos.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Extratos de *Punica granatum* (romã) possuem atividade fungistática sobre as leveduras do gênero *Candida* (125µg/mL).
2. Os extratos da *P. granatum* promovem alterações nas células leveduriformes, com má-formação da parede celular, inibição do crescimento e agregação celular.
3. O extrato casca provoca danos mais severos às células leveduriformes das espécies *C. albicans* e *C. krusei* do que o extrato pericarpo.
4. A Espectrometria de Massas revela a presença de compostos fenólicos como: punicalagina, eduncolagina, galagildilactona e telamagrandina.

8. REFERÊNCIAS

- Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). J Agric Food Chem. 2005; 53(10): 4032-40.
- Adhami VM, Mukhtar H. Polyphenols from green tea and pomegranate for prevention of prostate cancer. Free Radical Res. 2006; 40: 1095-104.
- Afaq F, Zaid MA, Khan N, Dreher M, Mukhtar H. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. Exp Dermatol. 2009; 18: 553-61.
- Afaq F, Saleem M, Krueger C G, Reed J D, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NFkappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer. 2005a; 113: 423-33.
- Afaq F, Malik A, Syed D, Maes D, Matsui M S, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract modulates UV-B mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. Photochem Photobiol. 2005b; 81: 38-45.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18: 472-508.
- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17: 114-40.
- Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 2835-41.
- Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. Mycoses 1999; 42: 665-72.
- Alves SH, Lopes JO, Costa JM, Klock C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1997; 39: 359-61.
- Alzoreky N, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int J Food Microbiol. 2003; 80: 223-30.
- Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. Int J Food Microbiol. 2009; 134: 244-8.
- Anesini C, Perez C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol. 1993; 39: 119-28

Angiolella L, Stringaro AR, De Bernardis F, Posteraro B, Bonito M, Toccaceli L, *et al.* Increased virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 927-36.

Anibal PC. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos brutos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP, 2007.

Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol.* 1980; 25: 1–10.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979; 147: 267–72.

Arendrup M, Horn N, Frimodt-Moller N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection.* 2002; 30: 286–91.

Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, *et al.* Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E⁰) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 1148–57.

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, *et al.* Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition.* 2004; 23: 423–33.

Aviram M. Pomegranate juice as a major source for polyphenolic flavonoids and its most potent antioxidant against LDL oxidation and atherosclerosis. *Free Radical Res.* 2002; 36: 71–2.

Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis.* 2001; 158(1): 195–8.

Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, *et al.* Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:1062–76.

Azaizeh H, Fulder S, Khalil K, Said O. Ethnomedicinal knowledge of local Arab practitioners in the Middle East Region. *Fitoterapia.* 2003; 74: 98–108.

Badizadegan M, Khabbazian GH. Study of pomegranate cultivation in Fars Provinces, Publication nº. 7. Shiraz University Res. Cen. 1977, 69 pp. (in Persian).

Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 50-4.

Balashov S, Park S, Perlin DS. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKSI*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 2058-63.

Barbachan JJ, Domingues MG, Rados PV. Study of presence of *Candida* in inflammatory hyperplasias. *J Dent Res.* 1996; 75: 1100 (Abstract).

Bastidas RJ, Heitman J. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *PNAS.* 2009; 106: 351-2.

Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer-a mini review. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60: 139-144.

Bendel CM. Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis. *Semin Perinatol.* 2003; 27: 357-64.

Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genetic.* 2002; 3: 918-30.

Bernhardt H, Knoke M. Mycological aspects of gastrointestinal microflora. *Scand J Gastroenterol.* 1997; 32 (Suppl 222): 102-6.

Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, *et al.* Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96: 335-9.

Brandes D, Freitas EAG. Taninos condensados: uma ferramenta para melhorar o desempenho de ruminante. *Agropecuária Catarinense.* 1992; 5: 44-8.

Brasil 2006. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, jun. 2006.*

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review.* 1998; 56: 317-33.

Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune T, Montelli AC, Mondelli AL, *et al.* Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. *BMC Res Notes.* 2010; 3: 1-17.

Bruneton J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia.* 1ªed. Zaragoza, Espanha. Ed. Acribia, AS. 1991.

- Calderone RA: Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone RA (ed.): *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press 2002; 15–27.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9: 327-35.
- Calixto JB. Desenvolvimento de medicamentos: Ensaios pré-clínicos. Médicos. (Set/Out.): 1998, pp. 22-25.
- Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res. 1995; 74: 1152-61.
- Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 2477–82.
- Cao GH, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. AJCN. 2001; 73: 920–6.
- Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Kadosh D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. PNAS. 2009; 106: 599–604.
- Casini C, Dardanelli JL, Martínez MJ, Balzarini M, Borgogno CS, Nassetta M. Oil quality and sugar content of peanuts (*Arachis hypogaea*) grown in Argentina: their relationship with climatic variables and seed yield. J Agric Food Chem. 2003; 51: 6309–13.
- Castro HG, Casali VWD, Barbosa LCA, Cecon PR. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.), em diferentes épocas de colheita em Vicososa – MG. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 1999; 1: 29-33.
- Catão RMR, Antunes RMO, Arruda TA, Pereira MSV, Higino JS, Alves JA, *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Punica granatum linn.* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anal Clin. 2006; 38: 111-4.
- Celik I, Temur A, Isik I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. Food Chem Toxicol. 2009; 47: 145-9.
- Celik H, Özgen M, Serçe S, Kaya C. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. Sci Hort. 2008; 117: 345-8.
- Cherifi S, Robberecht J, Miendje Y. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. Acta Clin Belg. 2004; 59: 223–4.
- Chung K, Wei C, Johnson MG. Are tannins a double-edged sword in biology and health? Trends Food Sci Technol. 1998a; 9: 168-75.

Chung K, Wong TY, Wei C, Huang Y, Lin Y. Tannins and Human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutrition*. 1998b; 38: 421-64.

Chung KT, Lu Z, Chou MW. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem Toxicol*. 1998c; 36: 1053-60.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2. 2002. Wayne, Pa.

Coleman D, Sullivan D, Harrington B, Haynes K, Henman M, Shanley D, *et al*. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis*. 1997; 3: S96-S101.

Colina A, Aumont RF, Deslauriers N, Belhumeur P, De Repentigny L. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun*. 1996; 64: 4514-9.

Colombo AL, Nucci M, Park B J, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, *et al*. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2816-23.

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*. 2001; 1: 569–90.

Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Sparapani L, Spina M, Eleuteri AM, Fioretti E, *et al*. Pomegranate fruit components modulate human thrombin. *Fitoterapia*. 2009; 80: 301–5.

Czinner E, Hagymasi K., Blazovics A, Kery A, Szoke E, Lemberkovics E. *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L) Moench. *J Ethnopharmacol*. 2000; 73: 437–43.

De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D’Offizzi G, *et al*. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun*. 1996; 64: 466-71.

De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem Syst Ecol*. 1999a; 27: 445-9.

De Bruyne T, Pieters L, Witvrouw M, De ClercqE, Berghe DV, Vlietinck AJ. Biological evaluation of proanthocyanidins and related polyphenols. *J Nat Prod*. 1999b; 62: 954-8.

De Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17: 729–59.

De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun*. 2000; 68: 3172-9.

Diniz MFFM, Oliveira RAG, Medeiros ACD, Malta-Junior A. Momento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Universitária/UFPB, 1997, p. 148-153.

Dongari-Bagtzoglou A, Krashleva H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses of oral epithelial cells to *Candida albicans*. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 165–70.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11: 30–6.

Drago L, Mombelli B, Vecchi ED, Bonaccorso C, Fassina MC, Gismondo MR. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor? Int J Antimicrob Agents. 2000; 16: 545–7.

Droucht E, Dupont B. Evolution of antifungal agents: past, present and future. Rev Infect Dis. 1987; 9: S4–S14.

Du CT, Wang PL, Francis FJ. Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. J Food Sci. 1975; 40: 417–8.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J Agric Food Chemistry. 2009; 57: 1768-74.

Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. J Nutrit Biochem. 2001; 12: 404-21.

Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules. 2009; 14: 1808-17.

Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC Complement Altern Med. 2006; 6: 1-7.

El-Toumy SA, Rauwald HW. Two new ellagic acid rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. Planta Med. 2003; 69: 682-4.

Ellepola ANB, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. Ach Oral Biol. 1998; 43: 879-87.

Erköse G, Erturan Z. Oral *Candida* colonization of human immunodeficiency virus infected subjects in Turkey and its relation with viral load and CD4+ T-lymphocyte count. Mycoses. 2007; 50: 485–90.

Espinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of andilafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: Review of the literature. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 121-36.

Fauconnier ML, Beltrán R, Delcarte J, Dejaeghere F, Marlier M, du Jardin P. Lipoxigenase pathway and membrane permeability and composition during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* L. Cv. Bintje and Désirée) in different conditions. *Plant Biol.* 2002; 4: 77–85.

Fengchun H, Liu X, Chen H. Medicine for treatment of infectious oral diseases. Chinese Patent 1145793A, 1997.

Fetrow CW, Avila JR. Manual de medicina alternativa para o profissional. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2000, p. 590-592.

Filoché SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immun.* 2005; 20: 221–5.

Foglio MA. Um estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil [Tese]. Campinas: UNICAMP, 1996.

Fotos PG, Vincent SD, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 74: 41–9.

Fuentes VR, Exposito A. Las encuestas etnobotánicas sobre plantas medicinales en Cuba. *Rev Jard Bo Nacion Univ Habana* 1995; 16: 77-144.

Furletti VF. Suscetibilidade de isolados orais de *Candida* spp provenientes de pacientes com doença periodontal aos antifúngicos azólicos e a anfotericina B [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP, 2006.

Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, Correa CBV, Cavalheiro MVS, Santos RR, *et al.* Fitoterápicos. In: Workshop sobre biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas, 1996, Campinas, 1996. 17p., 29/04 - 01/05/1996. Organizado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia Andre Tosello.

Germaine GR, Tellefson LM. Effect of pH and human saliva on protease production by *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1981; 31: 323-6.

Gerson SJ. Oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1990; 1: 153-66.

Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLOS Pathog.* 2010; 6: 1-8

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 122–43.

Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 4581-9.

Girmeria C, Moleti ML, Micozzi A, Iori AP, Barberi W, Foà R, *et al.* Breakthrough *Candida krusei* fungemia during fluconazole prophylaxis followed by breakthrough zygomycosis during caspofungin therapy in a patient with severe aplastic anemia who underwent stem cell transplantation. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5395–96.

Goldman M, Cloud GA, Smedema M, LeMonte A, Connolly P, McKinsey DS, *et al.* Does long-term itraconazole prophylaxis result in in vitro azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses study group. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1585–7.

Gow NA, Perera THS, Sherwood-Hingham GW, Gregory DW, Marshall D. Investigation of touch sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scanning Microsc.* 1994; 8: 705–10.

Gracious Ross R, Selvasubramanian S, Jayasunder S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits - a preliminary study. *J Ethnopharmacol.* 2001; 78: 85-7.

Greenspan D. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 211-5.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:1172–7.

Gueritte F, Fahy J. The vinca alkaloids. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ (eds) *Anticancer agents from natural products.* Taylor and Francis, Boca Raton, 2005, pp 123–136.

Hagerman AE, Riedl KM, Jones AG, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, *et al.* High molecular weight plants polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 1887-92.

Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 2008; 13: 894-901.

Haslam E. *Practical polyphenols – from structure to molecular recognition and physiological action.* Cambridge: Cambridge University, 1998. 321p.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod.* 1996; 59: 205–15.

Hattori M, Kusumoto LT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull.* 1990; 38: 717-20.

Hazen KC, Mandell G, Coleman E, Wu G. Influence of fluconazole at inhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183: 89-94.

Heil M, Baumann B, Andary C, Linsenmair KE, Mckey D. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften*. 2002a; 89: 519-24.

Heil M, Delsinne T, Hilpert A, Schürkens S, Andary C, Linsenmair EK, *et al.* Reduced chemical defence in ant-plants? A critical re-evaluation of a widely accepted hypothesis. *Oikos*. 2002b; 99: 457-68.

Heinrich M. Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research*. 2000; 14: 479–88.

Heldt H. *Plant biochemistry and molecular biology*. University Press: Oxford, 1997.

Henry S, D'Hondt L, Andre M, Holemans X, Canon JL. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a head and neck cancer patient: a case report and review of the literature. *Acta Clin Belg*. 2004; 59: 220–2.

Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans*. 1993; 21: 1039–47.

Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 1962–5.

Hitchcock CA, Barrett-Bee KJ, Russell NJ. The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*. 1987; 25: 29–37.

Hoegl L, Ollert M, Korting HC. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. *J Mol Med*. 1996; 74: 135-42.

Höfling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IAT, Furletti VF, Foglio MA *et al.* Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. 2010. In Press.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias-Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 1027-31.

Howell AB. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2002; 42:273–278.

Hu W. Skin health inflammatory inducta and producing process thereof. Chinese Patent 1156617A, 1997.

Huang G, Wang H, Chou S, Nie X, Chen J, Liu H. Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PNAS*. 2006; 103: 12813–8.

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7: 336–41.

Hube B, Naglik J. Extracellular hydrolases. In: Calderone RA, ed. *Candida* and candidiasis. Washington, DC, USA: ASM Press. 2002; 107–22.

Hube B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases. *Curr Top Med Mycol*. 1996; 7: 55-69.

Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 1994; 14: 87-99.

Hube B, Turver CJ, Odds FC, Eiffert H, Boulnois GJ, Köchel H, *et al*. Sequence of the *Candida albicans* gene encoding the secretory aspartate proteinase. *J Med Vet Mycol*. 1991; 29: 129-32.

Hussein SAM, Barakat HH, Merfort I, Nawwar MAM. Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. 1997; 45: 819-23.

Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstrngens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58: 942-9.

Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 321-6.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases*. 2004; 10: 106–12.

Jayatilake JAMS, Samaranyake YH, Samaranyake LP. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34: 240–6.

Jialal L, Devaraj S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis. *J Nutr*. 1996; 126: 1053S–7S.

Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 35: 103–14.

Kakiuchi N, Hattori M, Nishizawa M. Studies on dental caries prevention by traditional medicines. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull*. 1986; 34: 720-5.

Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 120-8.

Kantarcioğlu AS, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19: 44-8.

Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44: 453-64.

Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart U, *et al.* Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett.* 1997; 400: 80-2.

Kennedy MJ. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. In McYinnis MR (ed.) *Current Topics in Medical Mycology*, Vol. 2, New York: Springer-Verlag, 1988: 73-169.

Khan N, Afaq F, Kweon M, Kim K, Mukhtar H. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res.* 2007; 67: 3475-82.

Kilkuskie RE, Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Bodner A, Cheng Y, *et al.* HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. *Bioorg Med Chem Lett.* 1992; 2: 1529-34.

Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, *et al.* Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 71: 203-17.

Kitchen DB, Decomez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 935-49.

Kong JM, Khang NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacology Singapore.* 2003a; 24: 7-21.

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 2003b; 64: 923-33.

Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effect of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartil proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2038-42.

Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 2002; 359: 1135-44.

Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; 50: 243-60.

Krcmery V, Grausova S, Mraz M, Pichnova E, Jurga L. *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients: report of three cases. *J Infect Chemother.* 1999; 5: 58-9.

Krogh P, Holmstrup P, Thorn JJ, Vedtofle P, Pindborg JJ. Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 63: 48-54.

Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses.* 2008; 52: 1–10.

Kulkarni AP, Aradhya MS. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chem.* 2005; 93: 319–24.

Kumamoto CA, Vences MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 2005; 59: 113–33.

Kuriyama T, Willians DW, Lewis MAO. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 405-7.

Kurnatowska AJ. Search for correlation between symptoms and signs of changes in the oral mucosa and presence of fungi. *Mycoses.* 2001; 44: 379-82.

Kuse ER, Chetchotisakd P, da Cunha CA, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, *et al.* Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet.* 2007; 369: 1519–27.

Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, *et al.* Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs.* 2005; 23: 11-20.

Lansky E, Shubert S, Neeman I. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. Symposium International Sobre El Granado (First International Symposium on the Pomegranate), Orihuela, Spain, Oct. 15-17, 1998.

Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109: 177–206.

Larrosa M, Tomas-Barberan FA, Espin JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem.* 2006; 17: 611-25.

Law D, Moore CB, Wardle HM, Ganguli LA, Keaney MG, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 34: 659–68.

Lee J, Watson RR. Pomegranate: a role in health promotion and AIDS? In: Watson, R.R. (Ed.), *Nutrients and Foods in AIDS.* CRC Press, Boca Raton, FL, 1998; 179–192.

Lev E, Amar Z. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of 20th century. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72: 191–205.

Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. 2006; 96: 254–60.

Lobo AM, Lourenço AM. *Biossintese de produtos naturais*. IST Pess, Lisboa: Portugal. 272p. 2007.

Loffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Flörl C, Einsele H. Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 151: 263–8.

Machado TB, Pinto AV, Pinto MCFR, Leal ICR, Silva MG, Amaral ACF, *et al.* *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 21: 279-84.

Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRN, Silva MG, Kuster RM. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Brazilian Chem Soc*. 2002; 13: 606–10.

Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. *Fruit phenolics*. CRC Press: Boca Raton, FL. 1990.

Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, Chaisson RE, Merz WG, Gallant JE. Risk factors of fluconazole-resistance candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*. 1996; 173: 219-25.

Magaldi S, Mata S, Hartung C, Verde G, Deibis L, Roldan Y, *et al.* *In vitro* susceptibility of 137 *Candida* sp. isolates from HIV positive patients to several antifungal drugs. *Mycopathologia*. 2001; 149: 63–8.

Magee PT, Chibana H: The genomes of *Candida albicans* and other *Candida* species. In: Calderone RA (ed.): *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press 2002; 293–304.

Makihira S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Nishimura H, Ishida K, *et al.* Bacterial and *Candida* adhesion to intact and denatured collagen *in vitro*. *Mycoses* 2002; 45: 389-92.

Malacrida CR, Motta S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em sucos de uva. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2005; 25: 659-64.

Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 14813–8.

Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle*. 2006; 5: 371-3.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: 230S-42S.

- Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, *et al.* Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*. 1999; 145(Pt 10):2701–13.
- Marichal P, Vanden-Bossche H, Odds FC, Nobels G, Warnock DW, Timmeran V, *et al.* Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 2229–37.
- Markakis P. *Anthocyanins as Food Colors*. New York: Academic Press, 1982.
- Marsh PD, Bradsha WDJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res*. 1997; 11: 176-85.
- Marston A, Hostettmann K. Plant molluscicides review. *Phytochemistry*. 1985; 24: 639-52.
- Mason TL, Wasserman BP. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*. 1987; 26: 2197–202.
- Matos FJA. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. Fortaleza: IOCE, 1989, 2v, p74-5.
- McCarrell EM, Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, El Sankary W, Naughton DP. Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C. *BMC Complement Altern Med*. 2008; 8: 1-7.
- McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 5896–904.
- McGhie TK, Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51: 702–13.
- Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro AR, Rocha MF, Rabenhorst SH, Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006; 48: 17-20.
- Meis JFGM, Lunel FMV, Verveij PE, Voss A. One-year prevalence of *Candida dubliniensis* in a Dutch University Hospital. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3139-40.
- Meis JFMG, Ruhnke M, DePauw BE, Odds FC, Siegert W, Verweij PE. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5: 150-3.
- Menezes EA, Mendes LG, Cunha FA. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(3): 354-5.

- Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS. *Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque. *J Herb Pharmacother*. 2006; 6: 79-92.
- Mese AAC, Bueno SJG, Betancur GLA. Productos naturales con actividad antimicótico. *Rev Esp Quimioterap*. 2004; 17: 325-31.
- Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(23): 6887-92.
- Mila I, Scalbert A, Expert D. Iron withholding by plant opolyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*. 1996; 42: 1551-5.
- Minces LR, Ho KS, Veldkamp PJ, Clancy CJ. *Candida rugosa*: a distinctive emerging cause of candidaemia. A case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. 2009; 41: 892-7.
- Mirdehghan SH, Rahemi M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Sci Hort*. 2007; 111: 120-7.
- Monod M, Borg-von Zepelin M. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*. 2002. 81: 114-28.
- Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, *et al*. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med*. 2002; 347: 2020-9.
- Morschhäuser J, Köhler G, Ziebuhr W, Blum-Oehler G, Dobrindt U, Hacker J: Evolution of microbial pathogens. *Phil Trans R Soc Lond*. 2000; 355: 695-704.
- Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 3640-5.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sinero J, Dominguez H, *et al*. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. 2001; 72: 145-71.
- Muñoz P, Sánchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Peláez T, Bouza E. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55: 188-93.
- Naqvi SAH, Khan MSY, Vohora SB. Antibacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medical plants. *Rev Fitoterapia*. 1991; 62: 221-8.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *J Braz Microb*. 2000; 31: 247-56.

Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 1996; 53: 143-7.

Nawwar MAN, Hussein SAM, Merfort I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry.* 1994; 36: 793-8.

Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool S, Sayeed S. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *J Food Sci.* 2007; 72: 341-5.

Negi PS, Jayaprakasha GK. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J Food Sci.* 2003; 68: 1473-7.

Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ. *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 1-19.

Neurath AR, Strick N, Li YY, Debnath AK. *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1056: 311-27.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007; 70: 461-77.

Nikawa H, Egusa H, Makihira S, Okamoto T, Kurihara H, Shiba H, *et al.* An *in vitro* evaluation of the adhesion of *Candida* species to oral and lung tissue cells. *Mycoses.* 2006; 49: 14-7.

Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, *et al.* *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*: *Mycoses.* 2003; 46: 471-8.

Nikawa H, Egusa H, Makihira S, Nishimura M, Ishida K, Furukawa M, *et al.* A novel technique to evaluate the adhesion of *Candida* species to gingival epithelial cells. *Mycoses.* 2002; 46: 384-9.

Nishizawa K, Nakata I, Kishida A, Ayer WA, Browne LM. Some biologically active tannins of *Nuphar variegatum*. *Phytochemistry.* 1990; 29: 2491-4.

Nobile CL, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1382-91.

Noverr MC, Falkowski NR, McDonald RA, McKenzie AN, Huffnagle GB. Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase: role of host genetics, antigen, and interleukin-13. *Infect Immun.* 2005; 73: 30-8.

Noverr MC, Huffnagle GB: Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol.* 2004; 12: 562-8.

Noverr MC, Noggle RM, Toews GB, Huffnagle GB. Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. *Infect Immun.* 2004; 72: 4996-5003.

Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun.* 2001; 69: 2957–63.

Odds FC. Pathogenic fungi in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 200-1.

Odds FC. *Candida* and candidiasis, 2nd edn. London, England: Bailliere, Tindall, 1988.

Odds FC. Morphogenesis in *Candida albicans*. *CRC Crit Rev Microbiol* 1985; 12: 45–93.

Odds FC, Brown AJ, Gom NA. Antifungal agents: mechanism of action. *Trends Micorbiol.* 2003; 11: 272-9.

Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. *Crit Ver Biotechnol.* 1993; 13: 1-55.

Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry.* 1993; 32: 507-21.

Olsen I. Oral adhesion of yeast. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 39–53.

Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumatani A, Sobue S, Fujiwara T, *et al.* Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1993; 27: 124-9.

Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, Pitart C, *et al.* *Candida* spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 18: 1-7.

Ozgen M, Durgac C, Serce S, Kaya C. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in mediterranean region of Turkey. *Food Chem.* 2008; 111: 703-6.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; 48: 503–35.

Parkinson T, Falconer DJ, Hitchcock CA. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1696–9.

Passos XS, Costa CR, Araújo CR, Nascimento ES, Souza LK, Fernandes Ode F, *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia.* 2007; 163: 145-51.

Patel M, Shackleton JT, Coogan MM. Effects of antifungal treatment on the prevalence of yeasts in HIV-infected subjects. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 1279-84.

Pemán J, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24: 23–30.

Pereira GE, Gaudillere JP, Pieri P, Hilbert G, Maucourt M, Deborde C, *et al.* Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *J Agric Food Chem.* 2006a; 54: 6765–75.

Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, *et al.* *In vitro* antibacterial and antiadherence effect of *Punica granatum Linn* extracts upon dental biofilm microorganisms. *Braz J Pharmacogn.* 2006b; 16: 88-93.

Pereira JV. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *P. granatum Linn.* sobre microrganismos formadores da placa bacteriana [tese]. João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba; 1998.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiásova S. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 515–21.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 133-63.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, *et al.*, and the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997–2005: an 8.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 2007a; 45: 1735–45.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, *et al.* Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by Clinical and Laboratory Standards Institute-recommended broth microdilution methods. *J Clin Microbiol.* 2007b; 45: 70–5.

Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, Kibbler C, Ng KP, Gibbs DL, *et al.* *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3578-82.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, *et al.* *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *C. neoformans* collected during 2001–2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004a; 48: 201–5.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal

agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol.* 2004b; 42: 3142–6.

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Diekema DJ. *In vitro* activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1723–7.

Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan DJ, *et al.* *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 870-872.

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994; 20: 127–33.

Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, Wattanapiromsakul C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. *Mycoses.* 2005; 48: 333-8.

Piispanen AE, Hogan DA. PEPped up: induction of *Candida albicans* virulence by bacterial cell wall fragments. *Cell Host Microbe.* 2008; 4: 1–2.

Polachek I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 170-4.

Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 2001; 72: 171-3.

Price MF, LaRocco MT, Gentry LO. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38: 1422–4.

Queiroz MVF. Atividade antifúngica de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal [tese]. João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba; 1998.

Ramirez-Zavala B, Reuß O, Park YN, Ohlsen K, Morschhäuser J. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLOS Pathog.* 2008; 4: 1-14.

Raska M, Belakova J, Krupka M, Weigl E. Candidiasis – Do we need to fight or to tolerate the *Candida* fungus? *Folia Microbiol.* 2007; 52: 297–312.

Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, *et al.* Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2007; 356: 2472–82.

Redding SW, Dahiya MC, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Fothergill AW, *et al.* *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004a; 97: 47-52.

Redding SW, Marr KA, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF. *Candida glabrata* sepsis secondary to oral colonization in bone marrow transplantation. *Med Mycol.* 2004b; 42: 479-81.

Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007; 73: 461-7.

Rex JH, Bennet JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, *et al.* A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidaemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1325–30.

Ribeiro MA, Paula CR, John R, Perfect JR, Cox GM. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal *Candida* strains isolated from HIV-infected women from Brazil. *Med Mycol.* 2005; 43: 647–50.

Ricci D, Giamperi L, Bucchini A, Fraternali D. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia.* 2006; 77: 310-2.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 1996; 20: 933–56.

Rindum J, Stenderup A, Holmstrup P. Identification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23: 406–12.

Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filoti J, *et al.* *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(2):735-41.

Rüchel R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeast of the genus *Candida*. *Microbial Sci.* 1986; 3: 316-9.

Ruechel R. Virulence factors of *Candida* species. In: Samaranayake LP, Macfarlane TW, eds. *Oral candidosis*. London, England: Butterworth & Co. (Publishers) Ltd, 1990; 47–65.

Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets.* 2006; 7: 495–504.

Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. Development of resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 291-5.

Ryley JF, Wilson RG, Barrett-Bee KJ. Azole resistance in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1984; 22: 53–63.

Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17: 73–81.

Sangeorzan JA, Bradley SF, Xiaogang H, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, *et al*. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med*. 1994; 97: 339–46.

Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol*. 2002; 5: 379–85.

Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2: 73–85.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*. 1997; 143: 405–16.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 2300–5.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 39: 2378–86.

Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2009; 19(1B): 321-4

Saviranta NM, Anttonen MJ, Von Wright A, Karjalainen RO. Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *J Sci Food Agric*. 2008; 88: 125-32.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000; 130: 2073s–85s.

Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991; 30: 3875-83.

Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazzi P, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci*. 2002; 70: 1023–33.

Schwartz E, Tzulker R, Glazer I, Bar-Ya'akov B, Wiesman Z, Tripler E, *et al*. Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *J Agric Food Chem*. 2009; 57: 9197–209

- Seeram NP, Zhang Y, Reed JD, Krueger CG, Vaya J. Pomegranate phytochemicals. In N. P. Seeram, R. Schulman, & D. Heber (Eds.), *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. New York: Taylor and Francis GROUP. 2006, pp. 3–29.
- Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta*. 2004; 348(1-2): 63-8.
- Seeram NP, Nair MG. Inhibition of lipid peroxidation and structure–activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 5308–12.
- Semanário Oficial 1994. Município de João Pessoa 1994. Lei Ordinária nº 7630 de 15 de julho de 1994. Semanário Oficial nº 393/1994 publicado no DOU em 19 de julho de 1994.
- Seneviratne CJ, Wong RWK, Samaranyake LP. Potent anti-microbial activity of traditional Chinese medicine herbs against *Candida* species. *Mycoses*. 2007; 51, 30–4.
- Shen J, Cowen LE, Griffin AM, Chan L, Kohler JR. The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *PNAS*. 2008; 105: 20918–23.
- Shepherd MG. Morphogenesis in *Candida albicans*. In: Prasad R (ed.) *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1991: 5–19.
- Sherwood J, Gow NA, Gooday GW, Gregory DW. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol*. 1992; 32: 439–47.
- Silva FL, Escribano-Bailon MT, Alonso JJP, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Anthocyanins pigments in strawberry. *LWT – Foods Science Technol*. 2007; 40: 374-82.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da UFSC / Porto Alegre: Editora da UFRGS, 6ª Ed. p. 577-84. 2007.
- Singh A, Singh PK. An ethnobotanical study of medicinal plants in Chandauli District of Uttar Pradesh, India. *J Ethnopharmacol*. 2009; 121: 324–9.
- Singh RP, Murthy KNC, Jayaprakasha GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 81–6.
- Singh B, Bhat TK, Sharma OP. Biodegradation of tannic in an in vitro ruminal system. *Livestock Production Science*. 2001; 68: 259-62.
- Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1988; 3: 47–52.

- Soll DR. Phenotypic switching. In: Calderone RA (ed.): *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press. 2002; 123–42.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005; 579: 200–13.
- Souza MP. *Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras*. Fortaleza: Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991. 385–8.
- Srivastava A, Akoh CC, Fischer J, Krewer G. Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia - grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 3180-5.
- Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK. Phlorotannin-protein interactions. *J Chem Ecol.* 1996; 22: 1887–99.
- Suffredini IB, Sader HS, Gonçalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD, *et al.* Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. *Braz J Med Biol Research.* 2004; 37: 379-84.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol.* 1998; 2: 329-34.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr Top Med Mycol.* 1997; 8: 15-25.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(25): 7449-54.
- Taffarello D. *Extratos de cajuru, Arrabiadaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot, obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica [Dissertação]*. São Paulo: USP, 2008.
- Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates. 2004.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat AH, Sokemen A. *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chem.* 2005; 90: 685–9.
- Thewes S, Kretschmar M, Park H, Schaller M, Filler SG, Hube B. *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and noninvasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol Microbiol.* 2007; 63: 1606–28.
- Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: *in vitro* susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 777–9.

- Touillaud MS, Thiébaud ACM, Fournier A, Niravong M, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F. Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 475–86.
- Toumy SAA, Rauwala HW. Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry.* 2002; 61: 971–4
- Tumbarello M, Tacconelli E, Caldarola G, Morace G, Cauda R, Ortona L. Fluconazole resistant oral candidiasis in HIV infected patient. *Oral Dis.* 1997; 3(Suppl. 1): S110–2.
- Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 9559–70.
- Ug A, Ceylan O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch Med Res.* 2005; 34:130-6.
- Van Bramer SE. An introduction to mass spectrometry. Widener University, Chester PA, 1998.
- Van Geldre E, Vergauwe A, Eeckhout EV. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol Biol.* 1997; 33: 199-209.
- Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* 1994; 2: 393-400.
- Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J.* 2006; 17: 223-7.
- Vasconcelos LCS, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* Linn as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses.* 2003; 46: 192-6.
- Vazquez JA, Lundstrom T, Dembry L, Chandrasekar P, Boikov D, Parri MB, *et al.* Invasive *Candida guilliermondii* infection: in vitro susceptibility studies and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16: 849–53.
- Verheij HM, Dijkstra BW. Phospholipase A2: mechanism and structure. In: Woolley P, Peterson SB, eds. *Lipases their structure, biochemistry and application.* New York, USA: Cambridge University Press, 1994; 119–38.
- Vermani K, Garg S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *J Ethnopharmacol.* 2002; 80: 49-66.
- Vickery MLE, Vickery B. Secondary plant metabolism. The Macmillan Press LTD: London, 1981.

Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 2800-02.

Viudes A, Pemán J, Cantón E, Úbeda P, López-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 767–74.

Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagica *Escherichia coli* O157:H7. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94: 49-54.

Wakiec R, Prasad R, Morschhäuser J, Barchiesi F, Borowski E, Milewski S. Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 2007; 50: 109-15.

Walker LA, MacCallum DM, Bertram G, Gow NA, Odds FC, Brown AJ. Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal Genet Biol.* 2009; 46: 210–9.

Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30: 96–101.

Walton MC, Lentle RG, Reynolds GW, Kruger MC, McGhie TK. Anthocyanins absorption and antioxidant status in pigs. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(20): 7940-6.

Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W, *et al.* Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). *J Nat Prod.* 2004; 67: 2096–8.

Wang H, Cao G, Prior RP. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 1997; 45: 304-9.

Wang CC, Chen LG, Yang LL. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Cancer Letters.* 1999; 140: 195-200.

Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johnson EM, von Fraunhofer NA, Williams EW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet.* 1988; ii:1310.

Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(Suppl 6): S389–93.

White TC, Holleman S, Dy F, Mirels, LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1704–13.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382-402.

- White TC. Increased mRNA levels of *ERG16*, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1482–87.
- White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol.* 1995; 177: 5215-21.
- White TC, Miyasaki SH, Agabian N. Three distinct secreted aspartic ptoteinase in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 1993; 174: 6126-33.
- Wingard JR. Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin Infect Dis.* 1994; 19(Suppl. 1): S49–53.
- Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med.* 1991; 325: 1274–7.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 309–17.
- Wrolstad RE. Anthocyanins. In: Francis FJ, Lauro GJ. (Ed.). *Natural Food Colorants*. New York: Marcel Dekker Inc., 2000. p. 237-252.
- Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. *In vitro* proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44: 311-6.
- Xu XL, Lee RTH, Fang HM, Wang YM, Li R, Zou H, *et al.* Bacterial pepti doglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase *cyr1p*. *Cell Host Microbe.* 2008; 4: 28–39.
- Yang YL, Lo HJ. Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect.* 2001; 34: 79-86.
- Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nut Food Res.* 2007; 51: 675-83.
- Zhang Q, Jia D, Yao K. Antiperoxidant activity of pomegranate peel extracts on lard. *Nat Pro. Res.* 2007; 21: 211–6.
- Zhang J, Zhan B, Yao X, Song J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against herpes virus in vitro. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 1995; 20: 556–8.

Zheng Y, Wang SY, Wang CY, Zheng W. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT – Food Science Technol.* 2007; 40: 49-57.

Zordan RE, Galgoczy DJ, Johnson AD. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *PNAS.* 2006; 103: 12807–12.

ANEXO 1

Meios de cultura

1. SDA - Sabouraud Dextrose Agar

Diferido enzimático de caseína	10g
Dextrose	40g
Ágar	15g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada. Aquecer em microondas para homogeneizar, sem deixar ferver. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

2. BHI - Brain Heart Infusion

Substrato nutriente (extrato de cérebro, coração e peptona)	27,5g
D(+)-glucose	2,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Hidrogênio fosfato di-sódico	2,5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada. Aquecer em microondas para homogeneizar, sem deixar ferver. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

ANEXO 2

Resina Dr. Spurr

ERL 4221	2,5mL
DER 736	2,0mL
NSA	6,25mL
DMAE	0,075mL

Colocar em um Becker (perfeitamente seco) os 3 primeiros itens, agitar por 10 minutos, adicionar o DMAE e agitar por mais 10 minutos, deixar descansar por 10 minutos e está pronto para uso.