

VIVIANE MATOSO DE OLIVEIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE ANFOTERICINA B E *Camellia sinensis*: ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE

GUARAPUAVA  
2012

VIVIANE MATOSO DE OLIVEIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE ANFOTERICINA B E *Camellia sinensis*: ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro  
Co-Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Guarapuava  
2012

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Oliveira, Viviane Matoso de  
O48a Associação entre anfotericina B e *Camellia sinensis*: atividade antifúngica e citotoxicidade / Viviane Matoso de Oliveira. -- Guarapuava, 2012  
xiv, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, 2012

Orientador: Emerson Carraro

Co-orientador: Najeh Maissar Khalil

Banca examinadora: Sydney Hartz Alves, Herta Dalla Santa

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Anfotericina B. 3. Antifúngico. 4. *Camellia sinensis*. 5. Chá preto. 6. *Candida sp.* 7. Chá branco. 8. Toxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

“O que agrada a Deus  
em minha pequena alma  
É que eu ame minha pequenez  
e minha pobreza

É a esperança cega  
que tenho em sua misericórdia”

(Ziza Fernandes)

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus e a todos que de alguma forma me apoiaram*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sua providência e cuidado em todos os momentos e por revelar a cada dia minha vocação. “*A alegria do Senhor é a nossa força!*”

Agradeço aos meus pais, Augusto Matoso de Oliveira e Evanilda Painko, por serem meus exemplos de garra e determinação.

Agradeço a minha irmã, Cynthia. *Obrigada por sua alegria!*

Agradeço às minhas amigas que, mesmo longe, estão sempre presentes e me apoiando: Solange, Laura, Luana, Mariana, Elaine e Michele.

Agradeço aos colegas Thaísa, Diani, Lualís, Lori, Débora, Daniel, Luiz Augusto, Talita, Ana e Luciana e todo o pessoal do laboratório de Nanotecnologia.

Agradeço aos irmãos de coração do Ministério Universidades Renovadas e ao Grupo de partilha de profissionais, que sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço a professora Dr<sup>a</sup> Tânia Tominaga pela ajuda com a cultura de células.

Agradeço a Elisângela, por sua amizade e apoio.

Agradeço a professora Dr<sup>a</sup> Angelita Mara de Souza, por sua contribuição na correção do texto.

Agradeço ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Emerson Carraro pela oportunidade de trabalho e por me ajudar a descobrir novos caminhos profissionais. *Obrigada pela paciência!*

Agradeço ao meu co-orientador Najeh Maissar Khalil, que foi de imensa ajuda para que este trabalho se realizasse. *Obrigada pela atenção, ajuda e pelas discussões no laboratório.*

Agradeço a CAPES pelo auxílio com a bolsa de estudos.

## RESUMO

A anfotericina B, apesar dos avanços na pesquisa de novos antimicóticos, ainda permanece como antifúngico de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas devido a sua potência e amplo espectro de ação. No entanto, seu uso é limitado devido a sua considerável toxicidade, que leva a importantes efeitos adversos. Diversos estudos têm mostrado uma variedade de compostos naturais agindo em associação com a anfotericina B, melhorando sua atividade *in vitro* e conseqüentemente, propiciando a redução de sua dose. Este estudo teve como objetivo demonstrar o efeito do chá branco e preto obtidos da planta *Camellia sinensis* em relação a dois efeitos *in vitro* exercidos pela anfotericina B: atividade antifúngica frente a diferentes cepas de *Candida* sp e citotoxicidade em hemácias, leucócitos polimorfonucleares e células Vero. Os testes de atividade antifúngica com chá preto e chá branco isolados e, em combinação com anfotericina B, foram realizados através de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute, com algumas modificações, sendo utilizadas três cepas da American Type Culture Collection e oito cepas isoladas de material clínico. O teste de citotoxicidade em hemáceas foi realizado através da leitura espectrofotométrica de absorbância da hemoglobina liberada pela hemólise induzida por anfotericina B na presença de diferentes concentrações de chá preto ou chá branco. A citotoxicidade em leucócitos polimorfonucleares foi avaliada através da viabilidade celular obtida pelo teste de exclusão do corante azul de tripano. Quanto à citotoxicidade em células renais Vero, a viabilidade celular foi determinada através da redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Os resultados mostraram que tanto o chá branco quanto o chá preto apresentaram atividade antifúngica. De um total de onze cepas testadas, o efeito da associação do chá branco e do chá preto com anfotericina B, de acordo com o “Fractional Inhibitory Concentration Index” (FICI), foi aditivo para duas cepas com chá preto e quatro

cepas com o chá branco. Em relação à citotoxicidade em hemáceas, tanto o chá preto quanto o chá branco inibiram a hemólise induzida pela anfotericina B. A associação com chá preto e branco não alterou a citotoxicidade induzida por anfotericina em leucócitos polimorfonucleares e em células Vero. No presente estudo demonstrou-se que o chá branco e o chá preto apresentaram atividade antifúngica aditiva quando combinados com anfotericina B frente algumas cepas de *Candida* sp., além de efeito protetor da toxicidade da anfotericina B em hemáceas. Os resultados obtidos apontam para a necessidade de estudos futuros mais aprofundados quanto ao uso potencial do chá branco ou chá preto em associação com anfotericina B para melhorar sua eficácia antifúngica e/ou reduzir sua dose para minimizar seus efeitos adversos.

Palavras chave: anfotericina B, antifúngico, chá preto, *Camellia sinensis*, *Candida* sp., chá branco, toxicidade

## ABSTRACT

Amphotericin B, despite the advances in the research of new antifungal, still remains as antifungal of choice in the treatment for most systemic fungal infections due to the potency and wide spectrum of action. However, its use is limited due to its considerable toxicity, which leads to important side effects. Several studies have showed a range of natural compounds acting in association with amphotericin B, improving its activity *in vitro* and, consequently, reducing its dose. The aim of this study was to demonstrate the effect of white and black tea obtained from the plant *Camellia sinensis* in relation to two *in vitro* effects caused by amphotericin B: antifungal activity due to different strains of *Candida* sp and cytotoxicity in erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes and Vero cells. Tests for antifungal activity with black and white tea, alone and in combination with amphotericin B were performed by broth microdilution according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute, which used three strains of American Type Culture Collection Strains and eight clinical isolates. The cytotoxicity experiment was performed through spectrophotometric reading on erythrocyte absorbance released by the hemolysis induced by amphotericin B in the absence and presence of different concentrations of black and white tea. The cytotoxicity of polymorphonuclear leukocytes was assessed by cell viability test obtained by excluding trypan blue dye. The cell viability of Vero cells was determined by reducing the bromide 3 - [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-difeniltetrazolium (MTT). The results showed that both white tea and black tea showed antifungal activity. From a total of eleven strains tested, the effect of the combination of white tea and black tea with amphotericin B, according to the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was additive for two strains with black tea and four strains with white tea. Concerning cytotoxicity on erythrocytes, both black tea and white tea inhibited hemolysis induced by amphotericin B. The association with black tea or white tea did not alter the amphotericin-

induced cytotoxicity in Vero cells and polymorphonuclear leukocytes. In the present study, it was demonstrated that white tea and black tea have additive antifungal activity when combined with amphotericin B against some strains of *Candida* sp. in addition to the protective effect of the toxicity of amphotericin B in erythrocytes. These results suggest that white and black teas deserve more detailed studies regarding the future potential use in combination with amphotericin B for antifungal improve their effectiveness and / or reduce your dose to reduce adverse effects.

**Key-words:** amphotericin B, antifungal, black tea, *Camellia sinensis*, *Candida* sp., white tea, toxicity

## **Lista de Figuras**

**Figura 1** - Estrutura molecular da anfotericina B

**Figura 2** - Representação esquemática da interação entre a anfotericina B e colesterol em uma bicamada de fosfolípido

**Figura 3** - Arbusto de *Camellia sinensis* (L.) Kuntz

**Figura 4** - Estrutura química das catequinas – polifenóis de *C. sinensis*

**Figura 5** - Estrutura química de tearubigina, teaflavina e teasinensina – polifenóis de *C. sinensis*

**Figura 6** - Efeito inibitório dos chás branco e preto na hemólise induzida por anfotericina B (16 µg/mL)

**Figura 7** - Efeito do chá preto (131,5 µg/mL) e chá branco (176 µg/mL) em leucócitos polimorfonucleares e citotoxicidade induzida por anfotericina (40 µg/mL)

**Figura 8** - Efeito da anfotericina B (20 µg/mL) isolada e em combinação com o chá preto (118,4 µg/mL) e chá branco (119,1 µg/mL) em células Vero

## Lista de Tabela

**Tabela 1** - Atividade antifúngica da anfotericina B isolada e em combinação com chá preto e chá branco contra 11 cepas de *Candida* sp. pelo ensaio de microdiluição em caldo, norma M27A3 (CLSI) modificada

**Lista de abreviaturas**

|      |  |
|------|--|
| AmB  | Anfotericina B   |
| ATCC | American Type Culture Collection                                 |
| CIM  | Concentração Inibitória Mínima                                   |
| DMSO | Dimetil Sulfoxido  |
| DP   | Desvio Padrão  |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino tetra-acético                               |
| ECGC | Epigallocatequina galato   |
| FICI | Fractional Inhibitory Concentration Índice                       |
| HIV  | Vírus da Imunodeficiência Humana                                 |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium                              |
| mM   | Mili Molar   |
| MOPS | Morpholinepropanesulfonic acid                                   |
| MTT  | 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide |
| nm   | Nano Metro   |
| PBS  | Phosphate Buffered Saline  |
| rpm  | Rotação por minuto   |

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| RESUMO.....   | i   |
| ABSTRACT.....   | iii |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1   |
| 1.1 Candidíase.....   | 1   |
| 1.2 Antifúngicos.....   | 3   |
| 1.3 Anfotericina B.....   | 5   |
| 1.3.1 Toxicidade e dificuldades da terapia antifúngica.....   | 9   |
| 1.3.2 Novas Estratégias terapêuticas.....   | 12  |
| 1.4. Tubos germinativos.....  | 14  |
| 1.5. <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....  | 15  |
| 1.5.1 Variedades e composição química do chá.....   | 17  |
| 1.5.2 Propriedades do chá.....  | 20  |
| 2. OBJETIVOS.....   | 25  |
| 2.1 Objetivo Geral.....   | 25  |
| 2.2 Objetivos específicos.....  | 25  |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 26  |
| 3.1 Materiais.....  | 26  |
| 3.1.1 Reagentes.....  | 26  |
| 3.1.2 Equipamentos.....   | 26  |
| 3.1.3 Micro-organismos.....   | 26  |
| 3.2 Métodos.....  | 27  |
| 3.2.1 Preparo do chá e obtenção do resíduo seco.....  | 27  |
| 3.2.2 Teste de sensibilidade antifúngica.....   | 28  |
| 3.2.3 Ensaio de inibição de tubo germinativo.....   | 30  |
| 3.2.4 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre hemáceas.....  | 31  |
| 3.2.4.1 Preparação das Hemáceas.....  | 31  |
| 3.2.4.2 Teste de hemólise.....  | 31  |
| 3.2.5 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre LPMN.....  | 32  |
| 3.2.5.1 Preparação da suspensão de LPMN.....  | 32  |
| 3.2.5.2 Teste de toxicidade.....  | 32  |
| 3.2.6 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre células Vero.....  | 33  |
| 4. RESULTADOS.....  | 35  |
| 4.1 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do chá preto e chá branco e atividade antifúngica da anfotericina B na ausência e presença de chá preto e chá branco..... | 35  |
| 4.2 Efeito sobre a formação de tubo germinativo de <i>C.albicans</i> .....  | 37  |
| 4.3 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre hemáceas.....  | 37  |
| 4.4 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre LPMN.....  | 38  |
| 4.5 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre células Vero.....  | 39  |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 41  |
| 5.1 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do chá preto e chá branco e atividade antifúngica da anfotericina B na presença de chá preto e chá branco.....            | 41  |

|  |    |
|--|----|
| 5.2 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre hemáceas.....     | 43 |
| 5.3 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre LPMN.....         | 45 |
| 5.4 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre células Vero..... | 45 |
| 6. CONCLUSÕES.....   | 47 |
| 7. REFERÊNCIAS.....  | 48 |
| 8. ANEXO 1.....  | 63 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Candidíase

A candidíase é uma doença fúngica oportunista, de origem endógena ou exógena causada pela proliferação de *Candida* sp. Este gênero é formado por aproximadamente 314 espécies, sendo atualmente 20 espécies responsáveis por infecções em seres humanos (KURTZAMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A *Candida albicans* é a espécie mais comumente recuperada de materiais clínicos de doentes e, geralmente, é responsável por 40-70% dos episódios de candidemia (COLOMBO et al, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Outras espécies de interesse clínico além desta última são *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*, porém já existem relatos de espécies emergentes como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua* e *C. viswanathii* (COLOMBO&GUIMARAES, 2003; SOBEL, 2006; KABBAR et al, 2008; HORN et al, 2009). Variações geográficas importantes têm sido observadas na etiologia das infecções por *Candida* sp. Entre as espécies não-*albicans* se nota o predomínio de *C. glabrata* na América do Norte, enquanto na América do Sul o predomínio é de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (COLOMBO; GUIMARAES, 2003). O motivo para o aumento das espécies *Candida* não-*albicans* não está ainda esclarecido, mas alguns estudos apontam que a emergência de espécies não-*albicans*, principalmente *C. krusei* e *C. glabrata* está relacionada ao uso profilático ou empírico de drogas antifúngicas, enquanto que *C. parapsilosis* é mais frequentemente isolada de pacientes que fazem uso de cateteres e nutrição parenteral; por sua vez, *C. tropicalis* está mais associada a pacientes com câncer, neutropênicos ou receptores de medula óssea (COLOMBO et al, 2006; MEDRANO et al, 2006).

A patogenicidade destas espécies está fortemente relacionada a fatores como predisposição do hospedeiro (imunocomprometimento), virulência do fungo e número de

células fúngicas. As condições clínicas envolvem desde infecções superficiais da mucosa oral e vaginal até doenças sistêmicas fatais em pacientes imunocomprometidos (PFALLER 1996). A infecção é uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes em tratamento de neoplasias, transplantados e portadores do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), sendo por isso e também pelo aumento da incidência no mundo todo, uma grande preocupação para os clínicos (COLOMBO& GUIMARAES, 2003; NETO et al, 1997).

No ambiente hospitalar *Candida* sp. é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas (COLOMBO& GUIMARAES, 2003). Nos Estados Unidos, observou-se um aumento da ordem de 400% na incidência de candidemia nos principais hospitais americanos na década de 80 (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993) se tornando a quarta principal causa de infecção sistêmica na década de 90 (PFALLER et al, 1998). Atualmente estima-se que ocorram aproximadamente 300.000 casos de candidíase sistêmica por ano em todo o mundo (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). No Brasil estudos de vigilância que reuniram dados de quatro hospitais de São Paulo, *Candida* sp respondeu por 4,3% do total das infecções da corrente sanguínea (COLOMBO& GUIMARAES, 2003).

A candidemia é um grande problema de saúde pública em muitos países, pois apresenta índices de mortalidade geral de 60% e mortalidade atribuída de 40%, com diagnóstico e tratamento difíceis (WENZEL 1995; TUMBARELLO et al, 2007). No ambiente hospitalar a candidemia também é um fator que onera o sistema público de saúde, visto que a doença aumenta o tempo de internamento, elevando os custos de atendimento por paciente. O custo associado ao cuidado do paciente com candidemia está estimado em torno de 2 a 4 bilhões de dólares por ano, apenas nos Estados Unidos (RENTZ; HALPERN; BOWDEN 1998; WILSON et al, 2002).

O aumento na incidência das infecções fúngicas, bem como a mudança no perfil microbiológico das infecções sistêmicas que tem ocorrido nas últimas décadas provavelmente

esteja relacionado ao aumento da população suscetível. O crescente aumento do número de transplantes de órgãos; do uso de antibióticos; de procedimentos invasivos, como o uso de cateteres e nutrição parenteral; bem como o avanço na terapêutica de muitas neoplasias tem permitido o prolongamento da vida dos pacientes imunocomprometidos, os quais apresentavam altas taxas de mortalidade precoce, antes dos citados procedimentos tornarem-se comuns e mais acessíveis (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007; LAI et al, 2008; MURDOCH et al, 2009).

A alta prevalência da síndrome da imunodeficiência adquirida também contribuiu para a mudança no perfil microbiológico das infecções sistêmicas, bem como influencia diretamente nos índices de morbidade e mortalidade das infecções fúngicas, sobretudo nos países que apresentam alta prevalência do vírus HIV (HOF 2008; MURDOCH et al, 2009). Em trabalho que avaliou enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes com HIV que faziam uso de terapia anti-retroviral, verificou-se que 48,1% apresentaram *Candida* sp, sendo que 61,5% destas era *C. albicans*, 30,7% *Candida* não-*albicans* e 7,6% dos isolados não tiveram sua espécie identificada (PUPULIN et al, 2009). Ainda em outro estudo que avaliou taxas de sepse e de colonização por *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* em neonatos críticos, a taxa de sepse foi 13,6%, sendo que as candidemias responderam por 6%, associadas com uma letalidade de 33,3%. Os fatores de risco associados com a candidemia invasiva neste estudo foram o uso de cateter venoso central e antibioticoterapia prévia (GONDIM et al, 2009).

## **1.2 Antifúngicos**

Apesar dos avanços na pesquisa de novos antifúngicos, o número de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento das infecções sistêmicas ainda é limitado. A terapêutica tem se baseado na utilização de drogas como os imidazólicos, cetoconazol e miconazol, os triazólicos, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol e a anfotericina B (AmB) (PFALLER, 2012; LASS-FLÖRL, 2011).

O fluconazol é um dos antifúngicos mais prescritos para infecções fúngicas, sobretudo para profilaxia de pacientes imunocomprometidos. O fármaco possui excelente biodisponibilidade oral, farmacocinética linear, distribuição tecidual ampla e toxicidade reduzida comparado aos imidazólicos e AmB. No entanto, é comum o surgimento de resistência à droga nos pacientes que fazem seu uso prolongado, além do fato de algumas espécies de leveduras como *C. glabrata* e *C. krusei* possuírem resistência intrínseca ao fluconazol, o que leva à necessidade do uso de outros agentes com maior espectro de ação (LEWIS, 2011).

A introdução no mercado dos triazóis, itraconazol, voriconazol e posaconazol, proporcionaram aos clínicos novas perspectivas de terapia antifúngica, no entanto, os fármacos apresentam problemas de variabilidade farmacocinética e interações com outras drogas (LEWIS, 2011). Além disso, formulações orais de itraconazol podem desencadear efeitos adversos gastrointestinais, o que limita, sobretudo, seu uso em pacientes em tratamento para o câncer (MARR et al, 2004; PRENTICE; GLASMACHER, 2005).

Outra classe de antifúngicos são as equinocandinas, que consistem de lipopeptídeos semi-sintéticos que atuam por inibição da síntese de  $\beta$ -1,3-D-glucana presente na parede celular fúngica. Alguns agentes desta classe como anidulafungina, caspofungina e micafungina possuem atividade contra espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes aos azóis e AmB, mostrando-se uma ótima alternativa para tratamento. No entanto, as equinocandinas não apresentam atividade contra alguns fungos filamentosos e outras leveduras de importância médica, como o *Cryptococcus neoformans* (BENNETT, 2006; LEWIS, 2011). Sendo assim, mesmo com a introdução de novos agentes antifúngicos as candidemias continuam oferecendo o mesmo risco de morte que ofereciam há 20 anos e a AmB, devido a sua potência e amplo espectro de ação, ainda permanece como substância de escolha no tratamento da maioria das

micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (MURDOCH 2009; PAGANO et al, 2010).

### **1.3 Anfotericina B**

A AmB é um antibiótico poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, bactéria que habita os solos. Os compostos poliênicos são sintetizados a partir de genes altamente conservados na bactéria, que codificam enzimas policetídeos sintases, transportadores e outras proteínas necessárias (CAFFREY et al, 2001). Embora seja possível produzir AmB por síntese química, ela ainda é produzida em cultura, por razões econômicas, sendo extraída sob duas formas: anfotericina A e B. O composto foi isolado pela primeira vez em 1955 a partir de amostras de solo colhidas no Rio Orinoco na Venezuela e em 1956 conseguiu-se isolar a AmB na sua forma pura, que contém apenas 1 a 2% de anfotericina A. Em 1958, foi utilizada pela primeira vez no tratamento da paracoccidiodomicose e posteriormente passou a ser usado para tratamento de diversas infecções causadas por outras espécies de fungo (LACAZ; SAMPAIO, 1958; GOLD et al, 1956; LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; LANIADO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009). O composto possui 37 átomos de carbono com uma porção hidrófila (centro de hidrocarbono hidroxilado) e uma sequência de quatro a sete ligações duplas conjugadas com característica lipofílica. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um grupamento amino livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem aproximadamente 24 Å de comprimento, o que equivale à meia camada de fosfolípídeo. (Figura 1) (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005).

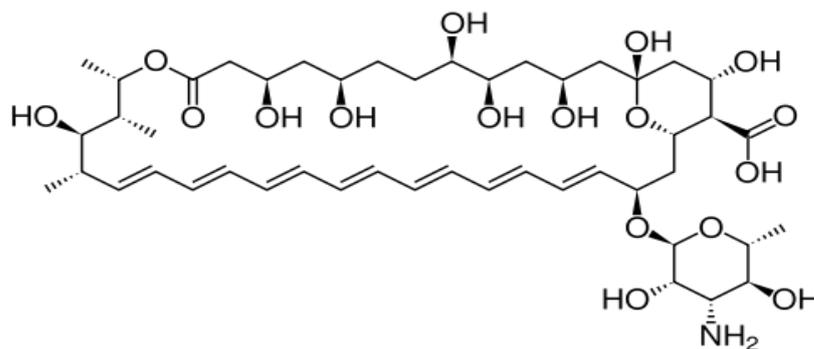


Figura 1 – Estrutura molecular da anfotericina B

O espectro de ação da AmB é amplo, incluindo quase todas as espécies de *Candida*, algumas espécies de *Aspergillus* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor* spp., *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides braziliensis* e *Penicillium marneffei* (ELLIS, 2002). A droga possui atividade máxima na faixa de pH 6,0 a 7,5, sendo inativada em valores de pH baixos e é sensível a luz. Pode assumir ação fungicida ou fungistática, que depende da concentração sanguínea e/ou tecidual atingida, além da sensibilidade ou resistência do micro-organismo (VARTIVARIAN; ANAISSIE; BODEY, 1993). No entanto, sua molécula é pouco solúvel na maioria dos solventes aquosos, sendo solúvel em dimetilsulfóxido, dimetilformamida e propilenoglicol. Para administração ao paciente, pelo fato de ser insolúvel em água, ela se apresenta em associação com detergente desoxicolato em tampão fosfato (FILIPPIN; SOUZA, 2006). No entanto, esse sistema não é homogêneo, podendo apresentar três formas diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de AmB misturados com micelas puras de desoxicolato, existindo um equilíbrio entre as formas, sendo a forma agregada a que está relacionada a maior toxicidade (LAMY-FREUND et al, 1991; LEGRAND et al, 1992).

A administração da AmB é feita quase que exclusivamente por via endovenosa, visto que sua absorção gastrointestinal é muito baixa. A droga é comumente infundida na dose de 0,5mg/Kg na concentração de 0,1mg/mL, diluída em soro glicosado e tempo de infusão que varia de duas a quatro horas (PATEL, 1998). No entanto, a administração de AmB por outras

vias tem sido utilizada em tentativas para fornecer terapia dirigida, reduzir os efeitos adversos e melhorar a penetração da droga em locais específicos da infecção, como o sistema nervoso central, pulmões e peritônio, sendo a AmB também administrada por via oral, endobrônquica, intratecal, intracisternal, intra-articular, oftálmica e intraperitoneal (ARTHUR; DREW; PERFECT, 2004).

A AmB possui grande afinidade por lipoproteínas, visto que a taxa de ligação às proteínas plasmáticas é de 95%. A droga distribui-se para os tecidos, devido sua afinidade de ligação ao colesterol presente nas membranas das células (PATEL, 1998).

O mecanismo de ação da AmB apresenta relação com suas características físico-químicas, bem como à sua ligação à parede celular fúngica. A droga liga-se ao ergosterol, componente da membrana celular do fungo que é análogo do colesterol presente em células mamíferas, formando poros. A configuração dos poros consiste em um anel de oito moléculas de AmB associadas hidrofobicamente com os esteróis de membrana, permanecendo os grupamentos hidroxilas orientados para o interior do poro. Os poros formam verdadeiros canais que permitem a passagem de componentes citoplasmáticos, principalmente íons potássio, sódio e magnésio (GHANNOUM; RICE, 1999; JUNG et al, 2009) (Figura 2). Devido a grande entrada de sódio e saída de potássio e magnésio, ocorre a ativação da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Para que os níveis de ATP intracelulares se mantenham a respiração mitocondrial é intensificada e o consumo de oxigênio aumentado. Quando a demanda supera a capacidade de produção de ATP, ocorre depleção energética, formação de radicais livres e acumulação de cálcio intracelular. Todos estes processos levam a lesões letais para as células via apoptose e necrose (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998).

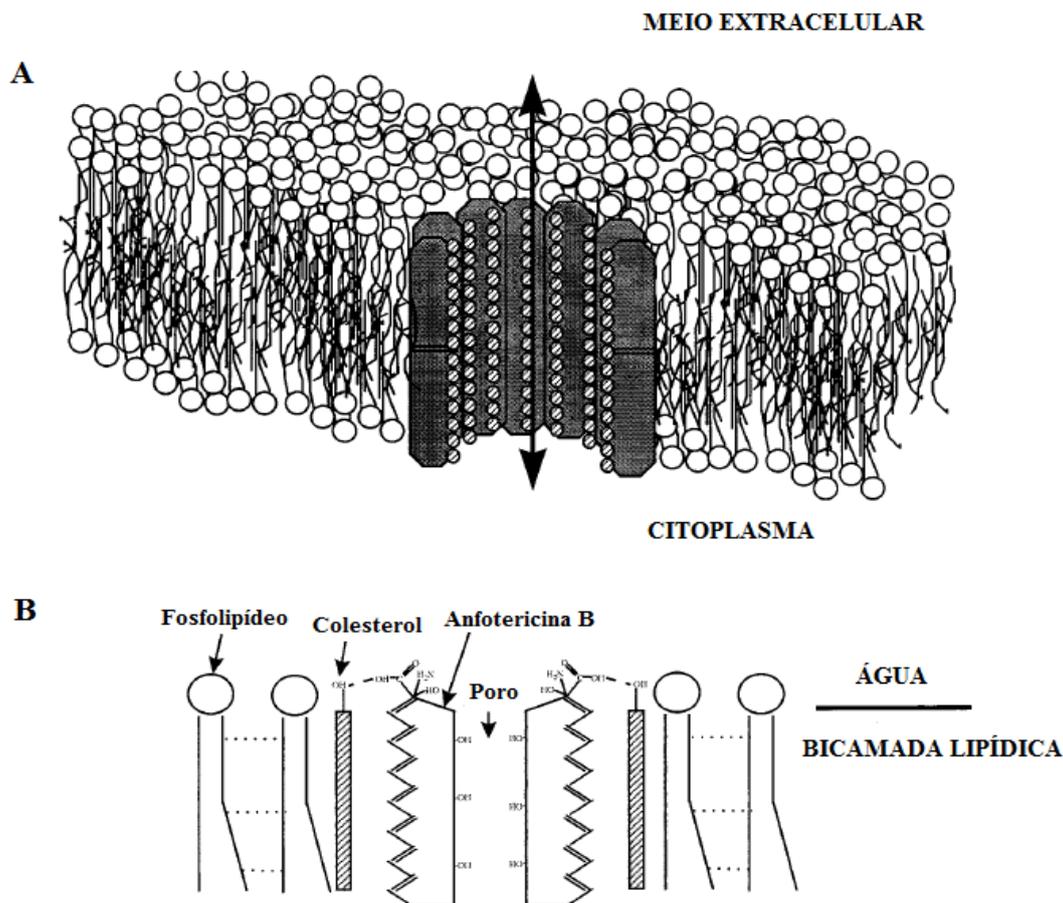


Figura 2 - Representação esquemática da interação entre a anfotericina B e esteróis de membrana. (A) Canal na membrana plasmática é formado pela união de poros. (B) Orientação molecular das ligações anfotericina B-esteróis formando os poros. As linhas pontilhadas entre as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolípidos representam as forças de van der Waals. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio formadas entre a anfotericina B e as moléculas de esteróis. Adaptado de Ghannoum et al (1999).

No entanto, estudos ainda se mostram controversos quanto à elucidação completa do mecanismo de ação da droga. Estudo de Gray et al (2012), por exemplo, demonstrou que a formação de canal não é necessária para a atividade fungicida e que o mecanismo de ação está simplesmente relacionado à ligação ao ergosterol, lipídio vital para muitos aspectos da fisiologia da célula fúngica. De acordo com este estudo, a permeabilização da membrana através da formação de canal representa um segundo mecanismo complementar que aumenta a potência e eficácia da droga. Além disso, diversos estudos demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na atividade antifúngica da AmB, sobretudo em *C. albicans*. A geração de

espécies reativas de oxigênio e radicais hidroxilas, promovida pela droga, levam a danos na célula fúngica através da oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios de membrana ou clivagem de DNA ou RNA (AN et al, 2009; OKAMOTO; AOKI; MATAGA, 2004). Esta teoria é reforçada por estudos que demonstram redução de atividade da AmB quando em condições de hipóxia (WARN et al, 2004).

### **1.3.1 Toxicidade e dificuldades da terapia antifúngica**

O fato de a AmB exibir afinidade ao colesterol explica em grande parte os muitos efeitos tóxicos que são descritos após a administração em pacientes (HUANG et al, 2002). Estudos *in vitro* mostraram que em níveis baixos a AmB aumenta a permeabilidade da membrana eritrocitária, enquanto em níveis mais altos causa lise da célula, levando à vazamento de potássio e hemoglobina (CYBUISKA et al, 1984; BRAJTBURG et al, 1980; CHEM et al, 1978; KNOPIK-SKROCKA; BIELAWSKI, 2002). No entanto, detalhes moleculares do mecanismo sobre eritrócitos ainda não estão esclarecidos. Alguns pesquisadores sugerem que o aumento da permeabilidade leva à lise celular, enquanto outros apontam que os dois efeitos não estão relacionados (CYBUISKA et al, 1984; BRAJTBURG et al, 1980; CHEM et al, 1978). Além disso, estudos demonstram que a intensidade de hemólise provocada por AmB, bem como a resistência à lise, são dependentes do sexo e variam de acordo com as propriedades individuais das membranas dos eritrócitos (KNOPIK-SKROCKA et al, 2005). Também já foi demonstrado que doenças malignas e a quimioterapia levam a pequenas modificações na organização da membrana eritrocitária, bem como na resistência osmótica dessas células, o que pode influenciar o processo de formação dos canais de membrana pela AmB (KNOPIK-SKROCKA et al, 2006).

Outros autores ainda demonstraram interação de AmB com a membrana de leucócitos polimorfonucleares, alterando a permeabilidade celular e levando à morte; no entanto, sem causar lise (CHUNN; STARR; GILBERT, 1977; MARZZULLO; SOUZA; CAMPA, 1997;

SUPAPIDHAYAKUL; KIZLAITIS; ANDERSEN, 1981). Outros autores descrevem importantes efeitos moduladores da droga sobre essas células, como inibição da quimiotaxia e diminuição da produção de anticorpos (BOGGS; CHANG; GOUNDALKAR, 1991; DRUMMOND et al, 1995). Pelo fato de possuir baixo índice terapêutico, a AmB apresenta mesmo em doses terapêuticas, sérias reações adversas. Entre os efeitos indesejáveis relacionados à infusão podem ser citados: febre, calafrios, náusea, vômitos, cefaléia e até mesmo arritmias cardíacas, convulsões e insuficiência hepática (LANIARDO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009). Já em relação aos efeitos decorrentes da toxicidade do fármaco em si, podem ocorrer anemia, leucopenia, trombocitopenia e nefrotoxicidade (PATEL, 1998). Este último representa o maior impasse na utilização da droga, devido sua alta incidência e morbidade. A utilização da droga quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, que varia em gravidade de um paciente para outro, sendo claramente relacionado à dose total. Em um estudo verificou-se danos renais em 24,8% dos pacientes que foram tratados com anfotericina (0,6 -1,0 mg/kg/dia) (MORA-DUARTE et al, 2002). Outro estudo também mostrou uma taxa de incidência de toxicidade renal semelhante, variando em torno de 25,0 a 50,0%, sendo que os mesmos pacientes apresentam em média uma elevação de 1,5 a 2,0 vezes nos níveis de creatinina sérica (BOWDEN et al, 2002). Elevação deste marcador renal também foi constatada por outros autores, chegando até a três vezes o limite superior normal (WALSH et al, 1999; MORA-DUARTE et al, 2002).

O mecanismo que leva à toxicidade está relacionado à disfunção do fluxo sanguíneo renal, resultando numa lesão estrutural direta nas células tubulares, diminuindo a taxa de filtração glomerular e, conseqüentemente, gerando distúrbios hidroeletrólíticos e desequilíbrio ácido-base. Sendo assim, as principais manifestações da nefrotoxicidade são a redução da filtração glomerular, além de hipocalcemia e hipomagnesemia causadas por lesão tubular direta, podendo ocorrer também acidose tubular renal e nefrocalcinose (BAGNIS; DERAY, 2002).

Efeitos de neurotoxicidade são raros, embora haja relatos que a droga pode levar a degeneração da bainha de mielina, comportamento psicótico, perda de audição e opacidade da visão (RACIS et al., 1990).

Outro fator limitante no tratamento das infecções fúngicas é a emergente resistência do fungo frente à ação das drogas disponíveis. Resistência à AmB, embora rara, tem sido descrita, principalmente em espécies de *Candida* não-*albicans*. Algumas espécies como *C. lusitaniae* e *C. guilliermondi*, possuem resistência intrínseca a AmB (KROGH-MADSEN et al, 2006; STERLING; MERZ, 1998). Em estudo de Dalazen e colaboradores (2011) demonstrou-se alta taxa de resistência a AmB (96,6%) quando avaliaram isolados clínicos de *Candida* sp. Essa resistência poderia estar relacionada à diminuição de ergosterol e/ou seus precursores na membrana das células fúngicas, visto que estudos com cepas mutantes de *C. lusitaniae* com defeitos na síntese do mesmo, demonstraram significativa resistência à AmB (YOUNG; HULL; HEITMAN, 2003).

A resistência aos antifúngicos azólicos também é descrita principalmente em espécies de *Candida* não-*albicans* e é comumente encontrada em pacientes que fazem uso profilático dessa classe de antifúngico, visto que estudos também demonstram uma crescente resistência ao fluconazol, voriconazol, posaconazol e equinocandinas em isolados de *C. glabrata* (PFALLER et al, 2011; LINGEGOWDA et al, 2011).

Essa situação implica diretamente na necessidade de se instituir tratamentos cada vez mais agressivos para as micoses sistêmicas invasivas; contudo, a opção seria doses obrigatoriamente mais altas das opções terapêuticas atuais, resultando em maior toxicidade para o paciente. Diante disso e de todas as limitações relacionadas com segurança, resistência, eficácia e emergência das infecções fúngicas torna-se relevante a pesquisa de novos compostos que sejam mais eficazes, menos tóxicos e com menor tendência a causar resistência.

Diante da problemática anteriormente apresentada, uma estratégia mais racional de tratamento poderia ser a redução de dose dos compostos atuais por combinação com novos compostos com atividade antifúngica. Os produtos naturais são protótipos atraentes para esse fim, devido ao seu amplo espectro de atividade biológica (NEWMAN; CRAGG, 2007). Muitas plantas são geralmente usadas na medicina popular como agentes antimicrobianos e antifúngicos, na forma de óleos essenciais e extratos. Além disso, o descobrimento e síntese de novas drogas naturais com alto efeito antifúngico e baixa toxicidade tornaram-se o foco de pesquisas farmacêuticas (JIANHUA; HAI, 2009; TEMPONE et al, 2008). Estratégias como essa podem contribuir na redução dos índices de mortalidade, na melhor adesão ao tratamento e no estado de saúde geral dos pacientes que sofrem com o uso da terapêutica atual.

### **1.3.1 Novas estratégias terapêuticas**

É comum a utilização de combinação de drogas, principalmente nos casos de infecções causadas por mais de um micro-organismo ou para combater o aumento da resistência microbiana. Um exemplo disso é o tratamento da tuberculose que consiste na associação de rifampicina, hidrazida e pirazinamida, além de etambutol e estreptomicina no caso de intolerância, alergia ou resistência aos tuberculostáticos (BRASIL, 1997). Outro exemplo é a frequente utilização de antibióticos beta-lactâmicos com fluoroquinolonas para tratamento de bacteremia causada por *Pseudomonas aeruginosa* (CHOW; YU, 1999).

Quando uma associação entre duas ou mais drogas resulta em soma dos resultados de cada droga separadamente, pode-se dizer que essa associação tem um efeito aditivo, enquanto que quando se tem um resultado em associação que não é diferente de quando as drogas são testadas isoladamente, diz-se que a associação é indiferente. Já o antagonismo é observado quando o resultado da associação é menor que o resultado da resposta aditiva e o efeito sinérgico, quando o resultado é maior que aquele esperado para cada composto

individualmente. Associações de dois ou mais antimicrobianos e associações de fármacos convencionais com produtos naturais vêm sendo avaliados em diversos estudos por método *in vitro*, sendo a técnica de “checkerboard” bastante utilizada (ODDS, 2003; GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995). Esta consiste no método de diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do composto isolado e em combinação, onde a análise dos resultados é feita pela determinação do “Fractional Inhibitory Concentration Index” (FICI), que é calculado pela seguinte equação:

$$FICI = (CIMa \text{ em combinação} / CIMa \text{ isolado}) + (CIMb \text{ em combinação} / CIMb \text{ isolado})$$

Onde *CIMa* e *CIMb* correspondem a CIM de diferentes compostos testados.

A combinação que apresentar valor menor que 0,5 é considerada uma combinação sinérgica, valores maiores que 4 é considerado antagonismo, valores ente 0,5 e 1 considera-se efeito aditivo e valores entre 1 e 4 considera-se como indiferente (ARIKAN et al, 2002).

A associação de AmB com outras drogas foi reconhecida como importante ferramenta na terapia antifúngica em 1979, quando Bennett et al, estudaram o efeito da associação de AmB com 5-fluorocitosina no tratamento de meningite criptocócica. Outros compostos continuaram a ser pesquisados para este fim, como no estudo realizado por Hachem et al (2006), no qual o EDTA, um agente quelante de chumbo, mostrou ter atividade sinérgica em associação com complexo lipídico de AmB sobre *Aspergillus fumigatus* em modelo experimental com ratos imunossuprimidos. Estudo de Venturini et al (2011) demonstrou efeito sinérgico de AmB com ibuprofeno em cepas de *Fusarium* spp. Outro estudo em cepas de *Fusarium* spp mostrou interação sinérgica entre AmB e caspofungina, AmB e voriconazol, AmB e rifampicina e AmB com 5-flucitosina (SPADER et al.,2009). Recentemente, o estudo de Menezes et al (2012) demonstrou ocorrer sinergismo entre amB e sinvastatina em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Estudos nesse sentido, porém associando compostos naturais, já vêm sendo feitos como, por exemplo, a demonstração de potencial atividade sinérgica entre óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* e AmB contra espécies de *Candida* sp. (ROSATO et al, 2008). Esse efeito também foi encontrado quando AmB foi associado à um extrato de semente de uva (*Vitis vinifera*), o que levou a uma queda significativa na contagem de colônias da levedura em amostras tratadas com esse extrato e AmB em relação as amostras testadas somente com AmB (HAN, 2007b). Atividade semelhante ainda foi observada quando se associou AmB com berberina, um alcalóide extraído da raiz da planta *Berberis vulgaris*, sendo que o efeito sinérgico foi confirmado por estudos com modelo de infecção animal (HAN et al, 2005). Em outros estudos, a atividade antifúngica da AmB foi potencializada pela presença de óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, popularmente conhecida como Canela da China e de *Coriandrum sativum*, conhecida como coentro (GIORDANI et al, 2006; SILVA et al, 2011). Sinergismo foi observado em pesquisas com outros compostos naturais, como a alicina, principal composto isolado do alho, a qual foi capaz de reduzir em mais de 10 vezes a CIM da AmB (AN et al, 2009). Este efeito também foi observado quando AmB foi associada à óleos essenciais extraídos de *Thymus maroccanus* e *Thymus broussonetii* (SAADA et al, 2010). Já em outro estudo com modelo animal, combinando AmB com galato de epigallocatequina, composto presente no chá de folhas de *C.sinensis*, demonstrou-se que o composto apresentava, além de efeito antifúngico sinérgico com AmB, a capacidade de impedir a formação de hifas por *C. albicans* (HAN, 2007a).

#### **1.4 Tubos germinativos**

Tubos germinativos são formados a partir de um blastoconídio após a germinação, processo pelo qual a levedura se reproduz. São estruturas definidas como extensões filamentosas de uma célula de levedura que tem cerca de metade da largura e três a quatro

vezes o comprimento da célula-mãe. Constituem-se de verdadeiras estruturas de hifas e não tem a constrição característica das pseudo-hifas (WINN et al, 2008, p.1211).

Alguns compostos com atividade antifúngica tem a capacidade de inibir a formação desses tubos, o que está diretamente relacionada à inibição de um importante fator de virulência do fungo, já que estas estruturas são pontos iniciais para formação de micélios que apresentam maior capacidade de aderência e penetração em células epiteliais humanas (HAMMER; CARSON; RILEY, 2000; CONSOLARO et al, 2005). Alguns estudos sugerem que cepas de *C. albicans* não produtoras de tubos germinativos se apresentam menos virulentas, quando comparadas com cepas produtoras (SAVILLE et al, 2003; KRUEGER et al, 2004).

Os tubos germinativos podem ser visualizados em ensaios *in vitro*, nos quais suspensões de leveduras são incubadas com soro fetal bovino ou albumina por aproximadamente 3 horas. Essas estruturas se apresentam como pequenas hifas produzidas a partir de um blastoconídio e não apresenta ponto de constrição (WINN et al, 2008, p.1211). O teste da formação do tubo germinativo é bastante utilizado para identificação presuntiva de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (SULLIVAN et al, 2004). Estudos também tem se utilizado desta técnica para avaliar a capacidade de inibição do tubo germinativo por compostos naturais com atividade antifúngica, direcionando prováveis mecanismos de ação (HAMMER; CARSON; RILEY, 2000; HAN, 2007a).

### **1.5 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze**

Desde a antiguidade plantas vêm sendo utilizadas como tratamento para diversas doenças, visto que os metabólitos secundários produzidos por elas constituem um grande arsenal de substâncias bioativas. Nesse sentido e com a necessidade de desenvolvimento de novas drogas, cresce cada vez mais o interesse científico em estudar essas substâncias (FABRICAN; FARNSWORTH, 2001; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Em muitos lugares do mundo plantas são utilizadas diretamente na forma de extratos brutos, infusões e chás. O consumo de chá é um hábito muito antigo que foi iniciada a mais de cinco mil anos nos países orientais. O chá é considerado uma das bebidas mais populares em todo o mundo e recentemente tem atraído a atenção devido às crescentes descobertas sobre seu benefício à saúde (WEISBURGER, 1997; THANGAPAZHAM et al, 2007). O seu consumo também desperta grande interesse econômico e social visto que são produzidos aproximadamente 3,8 milhões de toneladas de chá anualmente e consumidos em torno de 18 a 20 bilhões de copos de chá diariamente em todo o mundo (MARCOS et al, 1998; YANG et al, 2009).

Atualmente, os chás da planta *Camelia sinensis* (Figura 3) destacam-se entre os chás mundialmente consumidos devido às suas propriedades nutracêuticas, principalmente atividade antioxidante e prevenção da obesidade (UCHIYAMA et al, 2011; PANDEY; RIZVI, 2012). A planta pertence à família *Theaceae*, se apresenta na forma de arbusto ou árvore que pode chegar até 16m de altura. As folhas são oblongas, lustrosas, escuras, com nervuras nas superfícies, margens serradas e textura coriácea, sendo as folhas mais novas cobertas de tricomas brancos. As flores são pequenas e surgem nas axilas das folhas com pétalas brancas (FERRARA et al, 2001). A planta é originária da China e Índia, difundida para o Japão e em seguida para Europa e Rússia, chegando às Américas no século XVII, sendo atualmente cultivada em mais de 45 países, sobretudo em áreas tropicais e subtropicais, onde apresenta seu melhor desenvolvimento (WEISBURGER, 1997). As três variedades da planta são a *Camelia sinensis*. var. *sinensis*, *C. s*. var. *assamica* e *C. s*. var. *cambodiensis*. A primeira tem seu predomínio na China, Tailândia e Japão, a segunda predomina no sul e sudeste da Ásia, bem como na Austrália e a última não é usada comercialmente para fabricação do chá (WEISBURGER, 1997). No Brasil, a *C. sinensis* var. *sinensis* é cultivada predominantemente, porém há poucas plantações e seu cultivo está

associado a colônias japonesas. A *C. s.* var. *assamica* tem seu cultivo restrito apenas ao Vale do Ribeira no estado de São Paulo (SAITO et al, 2007).



Figura 3 – Arbusto de *Camellia sinensis* (L.) Kuntz (FONTE: <http://www.camellias-acs.com>)

### 1.5.1 Variedades e composição química do chá

Os chás resultantes do preparo da *C. sinensis* apresentam uma ampla variedade de constituintes químicos como compostos fenólicos, alcalóides, óleos voláteis, aminoácidos, lipídeos, polissacarídeos, vitaminas, além de elementos minerais (Cálcio, Flúor, Mangânes, Alumínio) (FORREST; BENDALL, 1969; PEREIRA et al, 2009; SANG et al, 2011). No entanto, sua composição pode variar conforme condições de cultivo, clima, época de colheita, parte da planta utilizada, entre outros fatores. Além disso, o método empregado na manufatura dos diversos tipos de chá a partir da *C. sinensis* também pode influenciar na sua composição química (ALMAJANO et al, 2008).

As variedades de chá de *C. sinensis* são resultantes do preparo diferencial das folhas terminais e gemas apicais da planta que podem ou não passar por processos de fermentação. Desse modo, mais de 300 tipos de chás podem ser fabricados a partir da planta por diferentes

formas de processamento. De forma geral, têm-se quatro tipos principais de chás: chá branco e chá verde (não fermentado), chá vermelho (semi-fermentado) e chá preto (fermentado) (SANG et al., 2011). O chá preto, variedade mais consumida no ocidente, representa aproximadamente 78% da produção mundial, seguido de chá verde e branco com 20% e do chá vermelho com 2% (CHAN; LIM; CHEW, 2007; SANG et al, 2011), sendo o consumo habitual destes chás, sob a forma de infusão, o que favorece a extração de compostos fenólicos (MORAIS et al, 2009).

Os principais compostos presentes no chá branco são os polifenóis, representados pelas catequinas e derivados, além de ácido gálico, cumárico, cafeico, alcalóides e pseudoalcalóides como a cafeína (RUSAC et al, 2008; GODOIN et al, 2010). Estes compostos são encontrados nos brotos fechados ou nas primeiras folhas da planta e o processo de obtenção do chá branco para comercialização se dá por um processo não fermentativo (SHARANGI et al, 2009; GODOIN et al, 2010). Este processo consiste em estabilização por aquecimento e secagem dos brotos e folhas, o que impede a oxidação das catequinas monoméricas através da inibição da enzima polifenol-oxidase. Desse modo, conserva-se quase todo o conteúdo original de polifenóis (CHAN et al, 2007; ALMAJANO et al, 2007; BANCIROVA, 2010). As folhas jovens da planta, com as quais são produzidos o chá branco e verde, são ricas em catequinas e constituem cerca de 30% de seu peso seco (WEISBURGER, 1997). As catequinas aparecem principalmente nas formas monoméricas de epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) e catequina (Figura 4) (CHOWA et al., 2011).

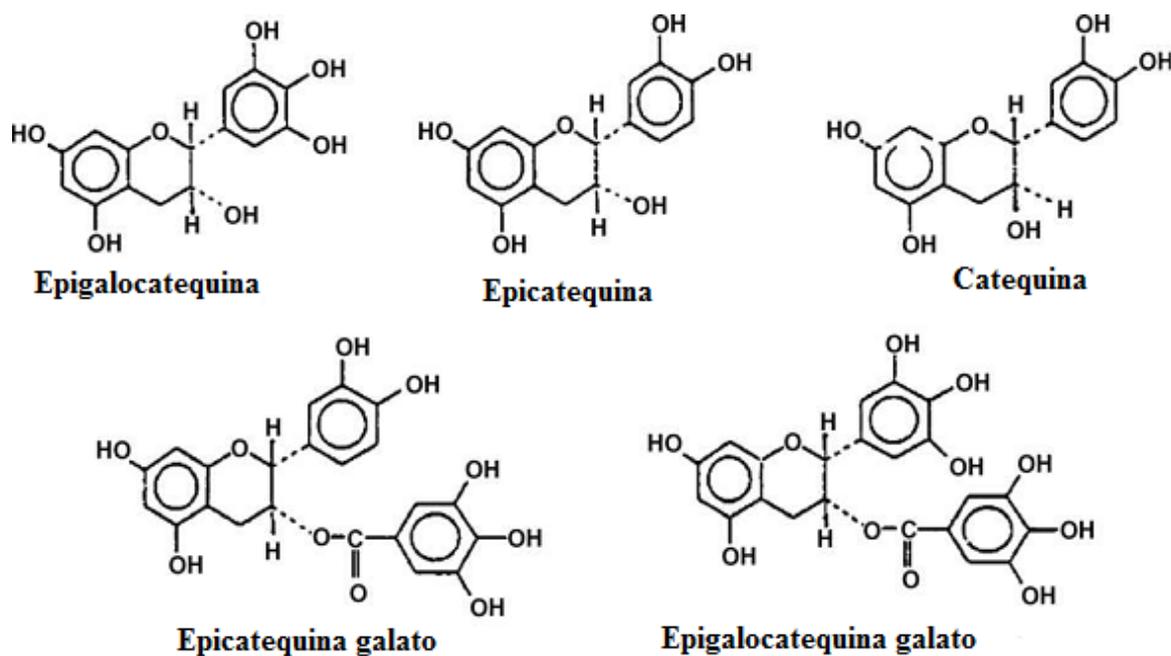


Figura 4 – Estrutura química das catequinas – polifenóis de *Camellia sinensis*. Fonte: adaptado de CHOWA, et al., 2011.

O chá preto apresenta como seus constituintes, além dos polifenóis, outros compostos como aminoácidos, metilxantinas, carboidratos, proteínas e elementos minerais. O processo para sua obtenção se dá pela fermentação completa das catequinas, gerando dímeros e polímeros destas, além de uma complexa mistura de polifenóis oxidados, constituída de teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas (LIMA et al, 2009; SHARANGI et al, 2009) (Figura 5). As teaflavinas se apresentam como dímeros (teaflavina, teaflavina-3-gallato, teaflavina-3'gallato, teaflavina-3,3'-digallato) e estão presentes no chá preto em torno de 3 a 6%, enquanto as tearubiginas são oligômeros encontradas de 12 a 18% no chá preto. Outros flavonóides como quercetina, mirecetina, kampferol, apigenina e luteolina também estão presentes em menor quantidade (PETERSON et al, 2005).

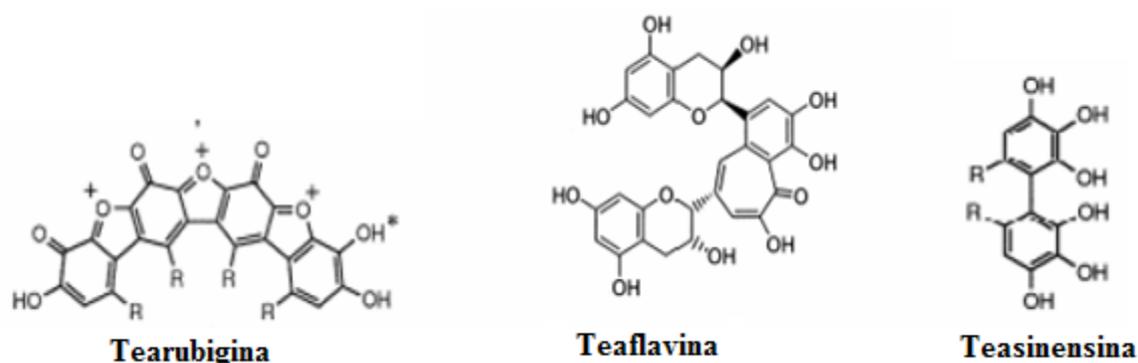


Figura 5 – Estrutura química de tearubigina, teaflavina e teasinensina – polifenóis de *Camellia sinensis*. Fonte: adaptado de HASLAM, 2003

Os polissacarídeos presentes tanto no chá preto, quanto no chá branco, também estão relacionados com muitas das propriedades biológicas referentes à *C. sinensis*, sobretudo, atividade anti-câncer e hipoglicêmica (NIE; XIE, 2011).

### 1.5.2 Propriedades do chá

O chá de *C. sinensis* desde sua origem é consumido, sobretudo, pelas suas propriedades medicinais, no entanto, por muito tempo isto se baseou apenas em evidências empíricas, o que não dava garantias de veracidade a cerca das propriedades atribuídas a ele. A *C. sinensis* foi introduzida no mercado farmacêutico na Europa devido sua ação lipolítica e diurética, principalmente como auxiliar em regimes dietéticos (COOPER; MORRÉ, 2005). Atualmente a pesquisa científica referente aos chás de *C. sinensis* e de seus constituintes é vasta, destacando-se as descobertas em relação à sua atividade antioxidante, sobretudo do chá verde de *C. sinensis* (CHAN et al, 2010; CIMPOIU et al, 2011; PANDEY; RIZVI, 2012).

O chá preto tem sido descrito como auxiliar para o controle do diabetes, visto que em estudos em pacientes não obesos, o chá reduziu os níveis de glicose (POLYCHRONOPOULOS et al, 2008). Outros estudos também demonstraram que o chá preto aumenta a sensibilidade à insulina, inibe a absorção de glicose intestinal, reduz a atividade de  $\alpha$ -glicosidade e  $\alpha$ -amilase,

além de melhorar a capacidade de tolerância à glicose (ABEYWICKRAMA et al, 2011; ISLAM et al, 2011).

Além disso, estudos demonstraram que o chá branco também se mostrou eficaz na redução de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides (ISLAM et al, 2011; BAHORUN et al, 2012). Em outro estudo, um extrato padronizado do chá preto mostrou que seus constituintes inibem a atividade da lipase pancreática, reduzindo o aumento de peso corporal de camundongos, bem como o conteúdo lipídico no fígado, sugerindo que o chá preto pode prevenir a obesidade (UCHIYAMA et al, 2011).

A pesquisa dos processos oxidativos celulares, bem como de agentes oxidantes e antioxidantes, tem recebido atenção especial, pois tais mecanismos estão diretamente associados a doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Nesse contexto o chá de *C. sinensis* também tem se mostrado com grande potencial de atividade, visto que há evidências de que o chá e seus contituantes inibem atividades enzimáticas e vias de transdução de sinal, resultando na supressão da proliferação celular, aumento do apoptose, inibição de invasão celular, angiogênese e metástase, além de inibir processos inflamatórios (YANG et al, 2009; YANG et al, 2011; SONG et al, 2011; KITAMURA et al, 2012).

Além disso, estudo demonstrou que compostos de ésteres lipofílicos sintetizados a partir de ECGC mostraram serem eficazes na inibição do câncer do cólon induzido por azoximetano em camundongos (ZHONG et al, 2012). Outro estudo ainda mostrou que o mesmo composto protege os miócitos cardíacos de lesões provocadas por doxorubicina, droga utilizada para tratamento de alguns tipos de câncer (ZHENG et al, 2011). A ECGC também se mostrou eficaz contra a carcinogênese induzida por cromo hexavalente, composto que ao ser inalado provoca a geração de espécies reativas de oxigênio que levam a lesões no DNA e consequente morte celular (WU et al, 2012).

Ainda foi demonstrada em estudos com humanos, uma potencial atividade moduladora do cérebro, melhorando função cognitiva e cardiovascular (SCHOLEY et al, 2012). Isso também foi constatado por outros autores: como Bruin et al (2011), que observaram melhora da função cognitiva em humanos após ingestão de chá preto; e Anandhan et al (2012) que sugerem efeito benéfico do chá preto sobre doenças neurodegenerativas, como o Parkinson.

Estudos acerca das propriedades de proteção do chá contra agentes tóxicos são também descritos, como o relatado por Grinberg et al (1997), os quais observaram que polifenóis do chá preto protegiam eritrócitos do dano oxidativo e lise induzidos por primaquina. Outros estudos ainda demonstraram que polissacarídeos obtidos das flores da planta ofereciam efeito hepatoprotetor frente à toxicidade induzida por tetracloreto de carbono em camundongos (XU et al, 2011). As catequinas e flavonóides do chá também se mostram eficazes na inibição da enzima álcool desidrogenase (MANIR et al, 2012).

A atividade antioxidante do chá de *C. sinensis* também tem sido objeto de pesquisa da medicina forense. Um exemplo é o estudo que avaliou a capacidade do chá preto de causar resultados falsos negativos em reações com luminol, reações estas usadas para detecção de manchas de sangue a olho nu. Devido à capacidade antioxidante verificou-se que o chá diminuiu a intensidade da reação e que o efeito é tempo dependente (BANCIROVA, 2011).

Quanto à atividade antimicrobiana, Bandyopadhyay et al. (2005) avaliaram o efeito do extrato metanólico de folhas secas de *C. sinensis* em 111 cepas bacterianas, sendo mostrada atividade, que foi confirmada em estudos *in vivo* em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Já em estudo com chá branco, este demonstrou a capacidade de inibir o crescimento de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (FRIEDMAN et al, 2006; ALMAJANO et al, 2008). No entanto, destacam-se os estudos referentes a seus componentes isolados, principalmente ECGC.

No estudo realizado por Park et al (2006) ECGC mostrou atividade antifúngica sobre 21 isolados clínicos de sete diferentes espécies de *Candida*, sendo *C. glabrata* a que apresentou maior sensibilidade. Evensen et al (2009) verificaram a ação de ECGC sobre a formação de biofilme por *C. albicans* e obtiveram redução de 75% de viabilidade celular. O mecanismo de ação do composto pode estar relacionado à sua ação antifolato, inibindo dessa maneira a via de biossíntese do ergosterol (NAVARRO-MARTINEZ; CANOVAS; RODRIGUEZ-LOPEZ, 2006). Estudos também mostram que o composto age sinergicamente com azóis, terbinafina e AmB (NAVARRO-MARTINEZ; CANOVAS; RODRIGUEZ-LOPEZ 2006; HAN, 2007a). O mesmo composto mostra-se ativo tanto contra bactérias Gram-negativas quanto positivas, sendo que o mecanismo demonstrou-se estar relacionado ao *stress* oxidativo, uma vez que se observou que a atividade era dependente da liberação de peróxido de hidrogênio em Gram-negativas, enquanto em Gram-positivas o composto levava a uma agregação das células bacterianas (CUIA et al, 2012). Também foi demonstrado que ésteres de ECGC produzidos sinteticamente apresentavam além de maior atividade antioxidante, maior atividade anti-viral, sendo mais eficaz que ECGC na inibição de protease do vírus da hepatite C e inibição de  $\alpha$ -glicosidase do vírus HIV (ZHONG; MAB; SHAHIDIA, 2011).

Quanto à atividade antimicrobiana do chá preto, Tiwari et al (2005) demonstraram inibição do crescimento de *Salmonella typhi*, *Salmonella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, além de apresentar nesse mesmo estudo um efeito sinérgico com diversos antibióticos como cloranfenicol, gentamicina, metilicina e ácido nalidíxico. Em outro estudo *in vitro*, o chá preto foi capaz de inibir a formação de biofilme causada por micro-organismos causadores de cáries como o *Streptococcus mutans*, além de suprimir alguns genes específicos relacionados a fatores de virulência (XU; ZHOU; WU, 2011). A teaflavina mostrou forte atividade contra *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii* e apresenta sinergismo com epicatequina contra as mesmas bactérias (BETTS; KELLY; HASWELL,

2011). O chá preto, bem como teaflavina e digalato de teaflavina também mostraram atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* (FRIEDMAN et al, 2006). Além disso, estudos demonstraram que um produto resultante de uma mistura de teaflavinas, provenientes do chá preto, mostrou ter atividade contra o vírus do HIV-1, impedindo sua entrada na célula através da ruptura de estruturas virais como o gp41 (YANG et al, 2012).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Testar a atividade antifúngica do chá preto e chá branco isoladamente e em associação com anfotericina B e investigar o possível efeito protetor dos chás sobre a toxicidade induzida pela anfotericina B em hemáceas, leucócitos polimorfonucleares e células Vero.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- 1) Determinar a CIM do chá preto, chá branco e AmB, isoladamente e em associação, frente a *Candida* sp. da coleção ATCC.
- 2) Determinar a CIM do chá preto, chá branco e AmB, isoladamente e em associação, frente a isolados clínicos de *Candida* spp.
- 3) Demonstrar o efeito do chá preto e chá branco frente à toxicidade exercida pela AmB em hemácias, leucócitos polimorfonucleares e células Vero.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Reagentes

Meio de cultura líquido RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), dimetilsulfóxido (DMSO), 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium brometo (MTT) e meio de cultura Iscove's Dulbecco's Modified (IMDM) foram adquiridos da Sigma<sup>®</sup> (St. Louis, MO, EUA). Ágar Sabouraud dextrose e caldo Sabouraud foram adquiridos da HIMEDIA<sup>®</sup> (Mumbai, India). Corante azul de tripano e glicerol foram adquiridos da Vetec<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). AmB (Iffect Chemphar Co., Ltd, China) foi gentilmente doada pelo mercado local. O chá branco (Prenda<sup>®</sup>, Rio Grande do Sul, Brasil) e e chá preto (Prenda<sup>®</sup>) utilizados foram adquiridos do comércio local. Para a realização de todos os experimentos propostos foram utilizados chás de mesmo lote, armazenados ao abrigo da luz e umidade.

##### 3.1.2 Equipamentos

Espectrofotômetro UV-Vis (Jasco<sup>®</sup>); Leitora de Micro placas (UV-Vis spectrometer Molecular Devices Spectra Max190), centrífuga (Benfer<sup>®</sup>), pHmetro (Lutron<sup>®</sup>), Balança analítica (Tecnol<sup>®</sup>), agitador magnético mini com resistência (Quimis<sup>®</sup>), câmara de fluxo laminar (Veco<sup>®</sup>), estufa bacteriológica (Quimis<sup>®</sup>), purificador de água miliQ<sup>®</sup>, Shaker (Quimis<sup>®</sup>), estufa de CO<sub>2</sub>(Quimis<sup>®</sup>).

##### 3.1.3 Micro-organismos

As cepas ATCC utilizadas foram: *C. albicans* 14053 e 64546, *C. krusei* 6258. Foram ainda utilizadas oito cepas isoladas de diferentes materiais clínicos, cedidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná. Todos os isolados foram previamente identificados pelo sistema Vitek<sup>®</sup> 2 (bioMérieux), sendo: *C. parapsilosis* LAC1, *C. utilis* LAC2, *C. albicans* LAC3, *C. kefyr* LAC4, *C. albicans* LAC5, *C. tropicalis* LAC6, *C. albicans* LAC13 e *C. albicans*

LAC15. As cepas foram mantidas em caldo Sabouraud com 50% de glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para uso, as mesmas foram previamente reativadas por repique em ágar sabouraud estéril e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Dois repiques foram realizados para assegurar sua pureza e viabilidade.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Preparo do chá e obtenção do resíduo seco**

O chá branco e o chá preto foram preparados sob a forma de infusão, pesando-se 0,5g de cada chá e colocados em contato com 25mL de água destilada estéril em ebulição. A infusão permaneceu por 30 minutos e em seguida os chás foram filtrados por 16 camadas de gaze hidrófila 9 fios (MediPluss®) originando as soluções mãe. Para o teste de atividade antifúngica, cada solução mãe foi dividida em alíquotas de 1mL e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (BANCIROVA, 2010). Para cada teste realizado uma alíquota foi descongelada e diluída em água estéril. Para o ensaio de toxicidade procedeu-se da mesma forma, sendo a infusão preparada com solução tampão fosfato 50mM, com 0,85% de NaCl (pH 7,4). As concentrações dos chás usados nos ensaios foram expressas de acordo com seu resíduo seco, o qual foi determinado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) da seguinte forma: placas de Petri sem tampa foram minuciosamente lavadas com água e sabão, desinfetadas com álcool 70°GL para posterior secagem em estufa. Depois de totalmente secas, as placas foram cuidadosamente retiradas da estufa com auxílio de pinça, resfriadas e obtidos os pesos individuais em balança analítica. As soluções mãe dos chás foram vertidas nas placas e mantidas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  até a completa evaporação. Depois disso, as placas foram novamente pesadas, sendo o resíduo seco determinado para cada chá como a diferença entre os pesos das placas após evaporação e os pesos iniciais das placas vazias. O procedimento foi realizado em duplicata. O rendimento obtido para o chá preto foi de 23,68% e para o chá branco foi de 31,68%. Desta forma, a concentração da solução mãe de chá preto utilizado, expressa em resíduo seco, foi de  $4736\mu\text{g/mL}$ , enquanto que para o chá branco, a concentração foi de  $6336\mu\text{g/mL}$ . A partir deste

dado, baseado nos volumes utilizados de cada tipo de chá utilizado nos ensaios, determinou-se a concentração real empregada de cada chá em cada ensaio.

### 3.2.2 Teste de sensibilidade antifúngica

a) Preparo do meio de cultura:

10,4g de RPMI-1640 com L-glutamina, vermelho fenol e sem bicarbonato de sódio foram dissolvidos em 900mL de água destilada estéril. Em seguida, acrescentou-se tampão MOPS (concentração final de  $0,165\text{mol.L}^{-1}$ ), agitando-se até dissolver. O pH foi ajustado sob agitação para 7,0 a  $25^{\circ}\text{C}$  usando hidróxido de sódio  $1\text{mol.L}^{-1}$ . Água estéril foi adicionada para levar o meio a um volume final de 1 L. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de  $0,22\mu\text{m}$  e armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

b) Preparo dos compostos testados:

10mg de AmB foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e procedeu-se uma série de diluições, originando uma faixa de concentração final que foi utilizada no teste antifúngico de  $2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $7,8125 \times 10^{-5}\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A solução mãe obtida da infusão do chá preto e branco foi submetida a uma série de diluições de razão 1:2 em água estéril originando uma faixa de concentração final de  $236,8\mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $7,4\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o chá preto e de  $316,8\mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $9,9\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o chá branco.

b) Inóculo:

Todas as cepas foram previamente inoculadas em ágar Sabouraud dextrose e incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 24 horas antes da realização dos ensaios. Posteriormente, escolheu-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1mm que foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,85%. A suspensão resultante foi colocada em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada empregando-se espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente a de uma solução-padrão da escala 0,5 de McFarland, em comprimento de onda de 530nm. Esse procedimento forneceu

uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640 para se obter o inóculo 2 vezes concentrado usado no teste (de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  CFU/mL). A concentração final após inoculação no teste foi de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL, conforme preconizado pela norma M27-A3 do CLCI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2008).

c) Teste antifúngico:

Primeiramente foram realizados testes para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da AmB em cepas ATCC e nas oito (08) cepas isoladas de material clínico, através do método de microdiluição em caldo de acordo com a norma M27A3 do CLSI com algumas modificações. Ensaio para determinar a CIM do chá branco e do chá preto isoladamente e em associação com AmB frente às mesmas cepas foram também realizados. O teste foi realizado em placas de microdiluição estéreis, com múltiplos poços, onde as diferentes concentrações de AmB e chá preto ou chá branco foram dispensadas em volumes de  $5 \mu\text{L}$  e  $10 \mu\text{L}$  respectivamente. Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado com  $100 \mu\text{L}$  da suspensão de levedura completando-se o volume final de cada poço para  $200 \mu\text{L}$  com meio RPMI. Os poços controle de crescimento (controle positivo) continham  $100 \mu\text{L}$  de meio estéril, isento de droga, e foram inoculados com  $100 \mu\text{L}$  da suspensão de levedura. O controle de crescimento com a mesma quantidade de DMSO utilizada na diluição da AmB também foi realizado. O controle de esterilidade do meio de cultura continha apenas  $200 \mu\text{L}$  de RPMI e o controle de esterilidade das infusões continham apenas chá preto ou chá branco e meio RPMI.

As placas de microdiluição foram incubadas a  $35^\circ\text{C} \pm 2$  por 24h, observando presença ou ausência de crescimento visível. A CIM foi definida como a menor concentração que não apresentou crescimento visível da levedura comparado ao crescimento do poço controle positivo. O conteúdo desses poços foram plaqueados em ágar Sabouraud dextrose com o intuito

de confirmar as CIMs determinadas por visualização macroscópica. Cada concentração foi avaliada em duplicata e cada cepa foi testada em três ensaios independentes, sendo a leitura realizada sempre por mais de um observador. A atividade sinérgica foi pesquisada por incubação de células de leveduras com os chás e AmB, ambos em concentrações sub-inibitórias. O “Fractional Inhibitory Concentration Index” (FICI) foi definido como a soma da CIM de cada droga quando testada em combinação dividida pelo CIM da droga testada sozinha. Os valores obtidos de FICI foram interpretados da seguinte forma:  $FICI \leq 0,5$  sinergismo,  $0,5 < FICI \leq 1$ , efeito aditivo;  $1 < FICI \leq 4$ , indiferente; e  $FICI > 4$ , antagonismo (ARIKAN et al, 2002).

Estes experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Brasil (Ofício 094/2012 – Anexo 1).

### **3.2.3 Ensaio de inibição de tubo germinativo**

Uma suspensão de *C. albicans* ATCC 64546 foi preparada a partir de colônias de cultura em ágar Sabouraud de 24 h dispersas em solução salina 0,85%. A suspensão foi padronizada em espectrofotômetro a 530nm resultando numa concentração de células fúngicas de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. Um volume de 100 $\mu$ L de soro fetal bovino foi colocado em cada poço de uma microplaca estéril. Em seguida, 100 $\mu$ L de chá preto (4736 $\mu$ g/mL) e 100 $\mu$ L de chá branco (6336 $\mu$ g/mL) foram adicionados isoladamente aos primeiros poços, a partir dos quais foram realizadas 5 diluições seriadas de razão 1:2 em soro fetal bovino. Depois disso, 10 $\mu$ L da suspensão de leveduras foram adicionados em cada um dos poços. O controle de formação do tubo germinativo foi realizado apenas com soro fetal bovino e suspensão de leveduras e no controle de inibição do tubo germinativo empregou-se adicionalmente fluconazol (62,5 $\mu$ g/mL). A placa foi incubada a  $35^\circ\text{C} \pm 2$  durante 3 horas. Após incubação, as células foram analisadas em aumento de 400x em microscópio óptico (ENDO, 2007).

### 3.2.4 Atividade citotóxica *in vitro* sobre hemáceas

#### 3.2.4.1 Preparação das Hemácias

O sangue total (5mL) de indivíduo voluntário sadio foi coletado em tubo com 10 $\mu$ L de heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi lavada com tampão fosfato 50 mM, com 0,85% de NaCl (pH 7,4), por três vezes. Os eritrócitos foram ressuspensos com o mesmo tampão e o volume globular foi ajustado para 5% (SILVA et al, 2000).

#### 3.2.4.2 Teste de hemólise

A 900 $\mu$ L da solução de eritrócitos a 5% foram adicionados 21 $\mu$ L de chá preto e 16 $\mu$ L de chá branco isoladamente, em diferentes concentrações (12,5 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> a 100 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e em associação com 20 $\mu$ L de AmB (16 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). O volume de cada tubo foi completado para 1000 $\mu$ L com PBS. Os tubos foram incubados a 37°C por 7 horas, com homogeneização constante. Após incubação, a solução de eritrócitos foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. Foi realizado controle contendo apenas solução de eritrócitos e PBS (pH 7,4) e controle de hemólise do solvente com 20 $\mu$ L de DMSO. O conteúdo de hemoglobina liberado, devido à ação hemolítica do composto avaliado, foi determinado no sobrenadante através da medida da absorvância em 540nm lida em espectrofotômetro (SILVA et al, 2001). Todas as amostras foram testadas em triplicata e em quatro ensaios independentes. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de inibição de hemólise induzida pela AmB, calculada pela seguinte fórmula: % inibição de hemólise = [(Ab-Aa)/Ab]×100, onde Ab é a absorvância do controle e Aa é a absorvância da amostra.

### **3.2.5 Atividade citotóxica *in vitro* sobre leucócitos polimorfonucleares (LPMN)**

#### **3.2.5.1 Preparação da suspensão de LPMN**

Sangue total coletado com heparina foi misturado a uma solução de dextran 6%. Esta mistura foi deixada em repouso à 37°C por 15 minutos. Após o repouso, o plasma rico em LPMN foi retirado e transferido para um tubo cônico e centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi lavado três vezes com PBS-Dulbecco com  $\text{Ca}^{+2}$  (pH 7,4) e centrifugado por 10 minutos a 2500rpm. As células foram ressuspensas em aproximadamente 2mL de PBS-Dulbecco com  $\text{Ca}^{+2}$  (pH 7,4) e contadas em câmara hematómica (CIZ; LOJEK, 1997).

#### **3.2.5.2 Teste de toxicidade**

A avaliação do efeito citotóxico da AmB sobre LPMN foi realizada através do teste de exclusão pelo corante azul de tripano, onde as células viáveis não incorporam o corante, apresentando-se brilhantes quando observadas em microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Em tubos cônicos, 30 $\mu\text{L}$  da suspensão de LPMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubados em PBS-Dulbecco com  $\text{Ca}^{+2}$  (pH 7,4) com 5 $\mu\text{L}$  de anfotericina ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) na presença de 5 $\mu\text{L}$  de chá preto ( $131,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) ou 5 $\mu\text{L}$  de chá branco ( $176 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), por duas horas, sob agitação constante em shaker, a 37°C. Para controle foi tomado a mesma quantidade de células incubadas com PBS. Após incubação, a suspensão de cada tubo foi misturada com uma solução de azul de tripano 0,4%, na proporção 1:1, por 5 minutos. As células foram observadas em microscópio e contadas como coradas ou não coradas em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade celular calculada em porcentagem (PHILLIPS, 1973). Cada concentração de chá foi testada em duplicata em dois ensaios independentes. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$  pela comparação entre as médias por ANOVA e pós teste de Tukey, onde os resultados expressos significam que letras diferentes correspondem a

valores que diferem entre si significativamente, e letras iguais valores que não diferem entre si significativamente.

### 3.2.6 Atividade citotóxica *in vitro* sobre células Vero

As células Vero (ATCC CCL-81) provenientes de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*, foram usadas neste ensaio como modelo de células renais. A linhagem celular foi cultivada em meio IMDM com 10% de soro fetal bovino, 10.000 UI.mL<sup>-1</sup> de penicilina e estreptomicina 10mg.mL<sup>-1</sup>, em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para os ensaios, as células Vero em crescimento exponencial foram tripsinizadas e ressuspensas em meio IMDM, contadas num hemocítômetro pelo método de azul de tripano e inoculadas em microplacas de 96 poços. Em cada poço, 1x10<sup>5</sup> células foram semeadas contendo meio de cultura e incubadas por 24h a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio foi trocado e as células aderidas foram incubadas por 24h com o meio fresco e 7,5µL de chá branco (119,1µg.mL<sup>-1</sup>) ou 10µL de chá preto (118,4µg.mL<sup>-1</sup>) isolados e em combinação com 5µL de AmB (20µg.mL<sup>-1</sup>). Previamente, a AmB foi dissolvida em DMSO e diluída usando o meio de cultura resultando em uma concentração final de 1% de DMSO, concentração esta que não interfere nos ensaios. Os controles foram sempre tratados com a mesma quantidade de DMSO usados nos experimentos. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS (pH 7,4) por três vezes. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada através do uso de MTT. O teste do MTT baseia-se na conversão (redução) dos sais amarelos de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas à cristais azuis de formazana (MOSMANN, 1983). A cada poço foi adicionado 50µL de MTT (1mg/mL) preparado em meio IMDM. Em seguida os poços foram incubados por 3 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, a solução de MTT foi removida e em seguida, 50µL de etanol e 150µL de uma solução contendo PBS e isopropanol (1:1) foram adicionados a cada

poço, a fim de solubilizar os cristais formados. A absorvância de cada poço foi lida em espectrofotômetro de microplaca em 550nm, sendo a absorvância obtida proporcional ao número de células viáveis. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O controle continha apenas células e meio de cultura. A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte equação: viabilidade celular (%) = (Absorvância das drogas / Absorvância do controle)  $\times$  100% (MENEZES, 2007). Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA com 95% de confiança. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$  pela comparação entre as médias pelo pós teste de Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Atividade antifúngica *in vitro* do chá preto e chá branco e atividade antifúngica da AmB na ausência e presença de chá preto e chá branco

Os testes de suscetibilidade antifúngica mostraram que tanto o chá branco, quanto o chá preto inibiram o crescimento das leveduras. O chá preto apresentou maior atividade antifúngica do que o chá branco em todas as cepas testadas, visto que os valores de CIM para o chá preto variou entre  $14,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $118,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que para o chá branco os valores de CIM ficaram entre  $79,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $158,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A maior concentração testada de chá branco foi de  $316,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foi incapaz de inibir o crescimento de *C. tropicalis*, a única, entre as cepas testadas, a se mostrar resistente ao chá branco, dentre as concentrações empregadas (Tabela 1).

Frente a duas cepas de isolados clínicos (*C. albicans* LAC15 e *C. parapsilosis* LAC1) e duas cepas ATCC (*C. albicans* 64546 e *C. krusei* 6258), o chá preto e o chá branco, quando associados com AmB, reduziram as CIMs em comparação com a AmB testada isoladamente. De acordo com os FICIs, os efeitos observados com a associação de AmB e os chás, nestas cepas, são considerados aditivos. A associação de chá preto com AmB gerou atividade antifúngica aditiva em duas cepas, enquanto que a associação com chá branco propiciou efeito antifúngico aditivo em quatro cepas. A associação entre o chá preto ou chá branco com AmB foi indiferente em nove e sete dos isolados testados, respectivamente. Antagonismo não foi observado com as associações testadas. Com a cepa de *C. albicans* ATCC 64546, observa-se que a CIM da AmB passou de  $2,5 \times 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $1,56 \times 10^{-4} \mu\text{g.mL}^{-1}$  na presença tanto de chá preto quanto do chá branco. Na cepa *C. krusei* ATCC 6258 ocorreu uma redução da CIM de  $2,5 \times 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $3,12 \times 10^{-4} \mu\text{g.mL}^{-1}$  na presença do chá branco, o que não ocorreu na presença do chá preto. Com a *C. albicans* LAC15 houve uma redução na CIM de  $2 \times 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $4 \times 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$  quando a AmB foi associada ao chá branco, enquanto foi indiferente ao

associá-la com chá preto. Já para a cepa de *C. parapsilosis* LAC1 houve uma redução na CIM de  $2 \times 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $5 \times 10^{-4} \mu\text{g.mL}^{-1}$  e de  $2 \times 10^{-2} \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $1 \times 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$  quando a AmB foi associada com chá preto e branco, respectivamente.

Tabela 1- Atividade antifúngica da AmB isolada e em associação com chá preto e chá branco frente a 11 cepas de *Candida* sp. pelo ensaio de microdiluição em caldo, norma M27A3 (CLSI) modificada

| Cepas                                | CIM Chá Preto ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | CIM Chá Branco ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | CIM AmB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | CIM AmB + Chá Preto ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | FICI Chá Preto + AmB Interpretação* | CIM AmB+ Chá Branco ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | FICI Chá Branco + AmB Interpretação* |
|--------------------------------------|---|--|-----------------------------------|---|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 14053) | 29,6                                    | 158,4                                    | $2,5 \times 10^{-2}$              | $2,5 \times 10^{-2}$                          | 2(I)                                | $2,5 \times 10^{-2}$                          | 2 (I)                                |
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 64546) | 29,6                                    | 79,2                                     | $2,5 \times 10^{-2}$              | $1,56 \times 10^{-4}$                         | 0,506 (A)                           | $1,56 \times 10^{-4}$                         | 0,506 (A)                            |
| <i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)    | 14,8                                    | 79,2                                     | $2,5 \times 10^{-1}$              | $2,5 \times 10^{-1}$                          | 2 (I)                               | $3,12 \times 10^{-4}$                         | 0,501 (A)                            |
| <i>Candida albicans</i> (LAC15)      | 29,6                                    | 158,4                                    | $2 \times 10^{-2}$                | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                               | $4 \times 10^{-3}$                            | 0,7 (A)                              |
| <i>Candida parapsilosis</i> (LAC1)   | 29,6                                    | 79,2                                     | $2 \times 10^{-2}$                | $5 \times 10^{-4}$                            | 0,525(A)                            | $1 \times 10^{-3}$                            | 0,55 (A)                             |
| <i>Candida utilis</i> (LAC2)         | 29,6                                    | 158,4                                    | $1 \times 10^{-1}$                | $1 \times 10^{-1}$                            | 2 (I)                               | $1 \times 10^{-1}$                            | 2 (I)                                |
| <i>Candida kefyr</i> (LAC4)          | 14,8                                    | 79,2                                     | $1 \times 10^{-1}$                | $1 \times 10^{-1}$                            | 2 (I)                               | $1 \times 10^{-1}$                            | 2 (I)                                |
| <i>Candida albicans</i> (LAC3)       | 14,8                                    | 158,4                                    | $2 \times 10^{-2}$                | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                               | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                                |
| <i>Candida tropicalis</i> (LAC6)     | 118,4                                   | > 316,8                                  | $5 \times 10^{-1}$                | $5 \times 10^{-1}$                            | 2 (I)                               | $5 \times 10^{-1}$                            | 2 (I)                                |
| <i>Candida albicans</i> (LAC5)       | 14,8                                    | 79,2                                     | $2 \times 10^{-2}$                | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                               | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                                |
| <i>Candida albicans</i> (LAC13)      | 14,8                                    | 158,4                                    | $2 \times 10^{-2}$                | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                               | $2 \times 10^{-2}$                            | 2 (I)                                |

\* (I) Indiferente; (A) efeito aditivo

#### 4.2 Efeito sobre a formação de tubo germinativo de *C. albicans*

O efeito do chá preto e chá branco de *C. sinensis* sobre a formação do tubo germinativo foi avaliado empregando-se suspensão de levedura em soro fetal bovino e diluições seriadas do chá preto ( $2368 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $9,25\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e chá branco ( $6336\mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $49,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Após o período de incubação, as células tratadas com os chás, com fluconazol ( $62,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e controle, contendo somente células, foram analisados microscopicamente; verificando-se que tanto chá preto quanto o chá branco não apresentaram a capacidade de inibir a formação do tubo germinativo em *C. albicans* em 100 células contadas. No controle, com células não tratadas, puderam-se observar estruturas que caracterizam o tubo germinativo.

#### 4.3 Atividade citotóxica *in vitro* sobre hemáceas

A porcentagem de inibição foi calculada com base no controle positivo (AmB  $16\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), cuja absorvância foi de  $1,31 \pm 0,05$  comparado ao controle negativo (apenas 5% de eritrócitos), cuja absorvância foi de  $0,008 \pm 0,0007$ . Os resultados foram expressos na figura 6. Podemos visualizar no gráfico que tanto chá preto quanto o chá branco foram capazes de inibir a hemólise induzida por AmB. Nas concentrações de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  o chá preto apresentou em média uma inibição de hemólise de  $63,31\% \pm 5,5$  e  $59,75\% \pm 3,13$  respectivamente, enquanto que para o chá branco, nas mesmas concentrações as inibições médias foram de  $52,18\% \pm 5,08$  e  $31,95\% \pm 10,1$ .

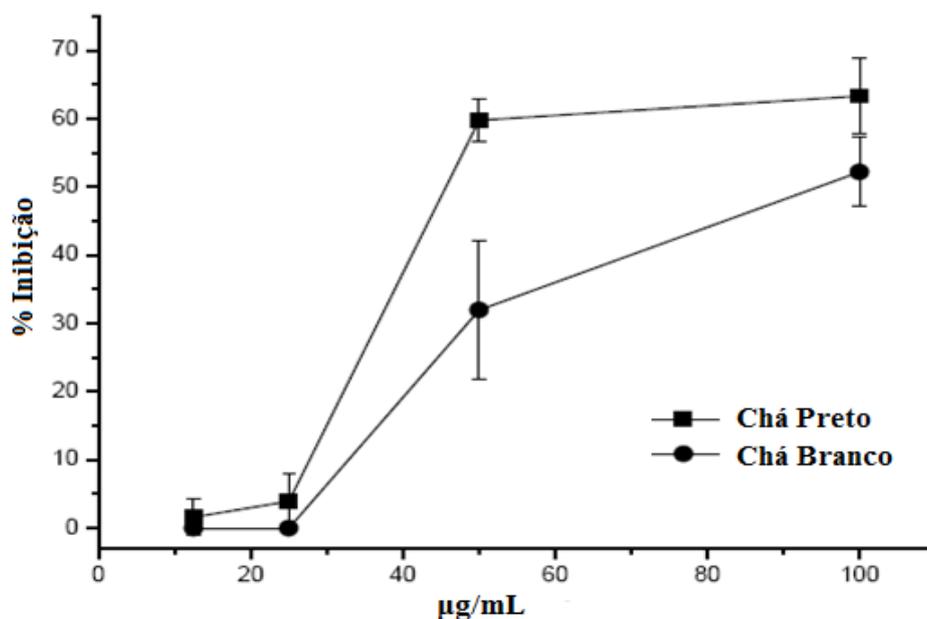


Figura 6- Efeito inibitório dos chás branco e preto na hemólise induzida por AmB ( $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Reação com 5% de eritrócitos incubados em PBS 50 mM, pH 7,4, por 7 horas, com concentrações diferentes de chá na presença de AmB. Dados na figura são expressos como média  $\pm$  DP.

#### 4.4 Atividade citotóxica *in vitro* sobre LPMN

A AmB ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) mostrou um efeito tóxico sobre leucócitos polimorfonucleares, reduzindo a viabilidade celular, significativamente em relação ao controle ( $p < 0,001$ ), para  $38,3\% \pm 2,4$ . O controle contendo somente LPMN apresentou viabilidade celular de  $97,85\% \pm 1,9$ . Chá preto ( $131,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e chá branco ( $176 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram inócuos para os leucócitos, sendo que os LPMNs tratados com os chás apresentaram viabilidade de  $97,29\% \pm 1,8$  e  $95,93\% \pm 0,98$  respectivamente, não havendo diferença estatística entre os mesmos e o controle. Quando AmB foi testada em combinação com o chá preto ou branco, a viabilidade celular manteve-se estatisticamente a mesma em comparação com AmB testada isoladamente, indicando ausência de efeito protetor dos chás sobre a toxicidade induzida por AmB em LPMN (Figura 7).

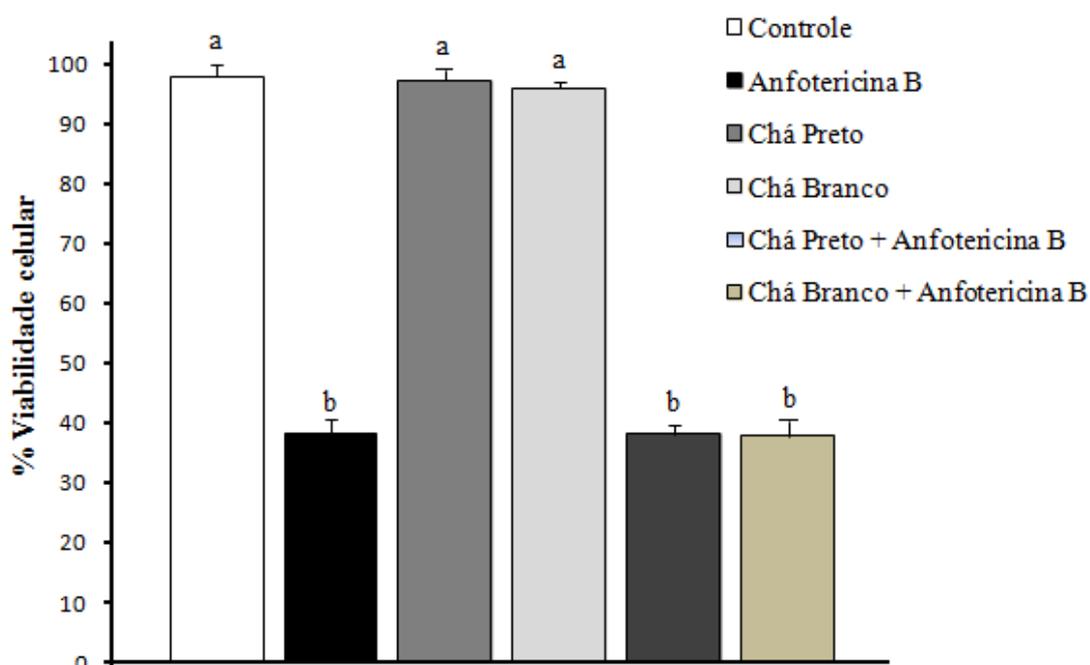


Figura 7 - Efeito do chá preto ( $131,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e chá branco ( $176\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em leucócitos polimorfonucleares e citotoxicidade induzida por AmB ( $40\mu\text{g/mL}$ ). Reação em PBS 50 mM (7,4) por 2 horas na presença e ausência de AmB. Dados na figura são expressos como média  $\pm$  DP. (a) e (b) representam diferença estatística entre os grupos analisados por ANOVA ( $p < 0,001$ ) e pós teste de Tukey.

#### 4.5 Atividade citotóxica *in vitro* sobre células Vero

O efeito tóxico da AmB em células Vero foi observado com o experimento, sendo que  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram responsáveis por uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) de aproximadamente 30% na viabilidade celular. O chá preto ( $118,4\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e chá branco ( $119,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não apresentaram efeitos tóxicos sobre as células, sendo que as células tratadas com os chás apresentaram viabilidade de  $97,8\% \pm 1,9$  e  $98,8\% \pm 2,3$  respectivamente, não havendo diferença estatística entre os mesmos e o controle. Também não houve diferença estatística significativa entre AmB testada isoladamente e em combinação com o chá preto ou branco indicando ausência de efeito protetor dos chás sobre a toxicidade induzida por AmB em células Vero (Figura 8).

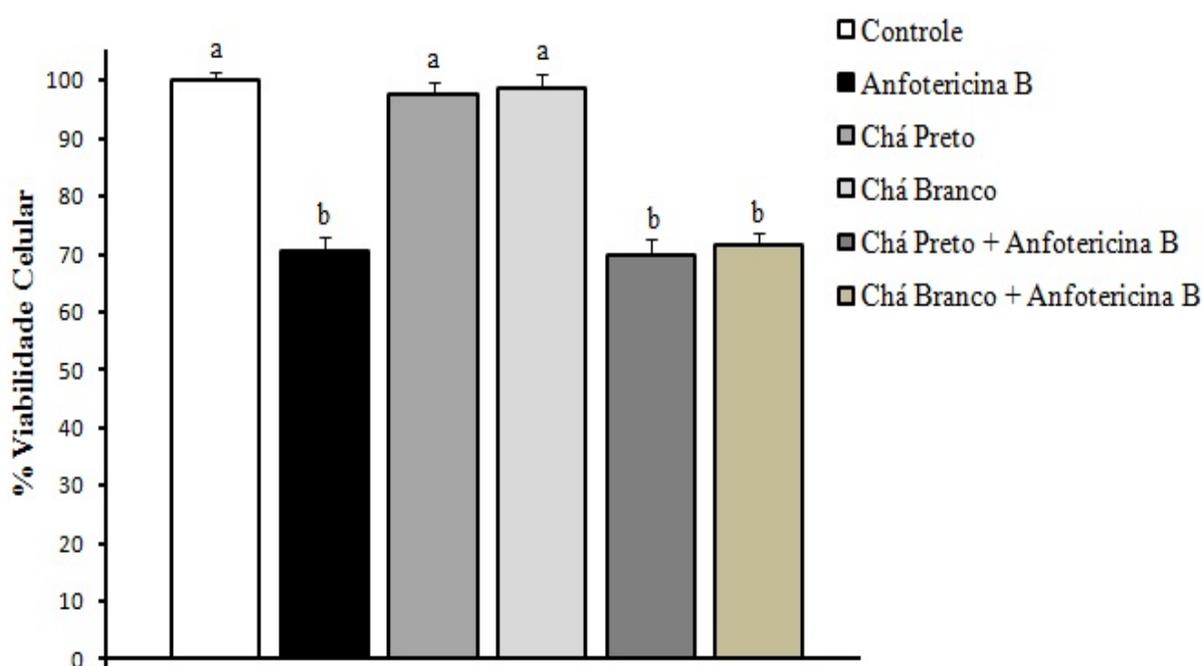


Figura 8-Efeito da AmB ( $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) isolada e em combinação com o chá preto ( $118,4\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou chá branco ( $119,1\mu\text{g/mL}$ ) em células Vero. Dados na figura são expressos como média  $\pm$  DP. (a) e (b) representam diferença estatística entre os grupos analisados por ANOVA ( $p < 0,001$ ) e pós teste de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade antifúngica *in vitro* do chá preto e chá branco e atividade antifúngica da AmB na presença de chá preto ou chá branco

Os testes de susceptibilidade antifúngica demonstraram que tanto o chá preto quanto o chá branco inibiram o crescimento de diferentes espécies de *Candida*. Apesar da maioria dos estudos a cerca da atividade antimicrobiana de *C. sinensis* envolver os produtos isolados da planta, o efeito inibitório da infusão de chá branco em *C. albicans*, demonstrado neste estudo, foi também observado por Almajano et al (2008). A maior atividade antifúngica do chá preto neste estudo, demonstrada por valores de CIMs menores em comparação às CIMs do chá branco em todas as cepas testadas, foi também encontrada por Camargo (2011), que ao comparar a atividade antifúngica de quatro diferentes chás obtidos de *C. sinensis* sobre cepas ATTC de *C. albicans* e *C. krusei*, demonstrou que o chá preto foi o mais efetivo. Este fato pode estar relacionado à maior quantidade de cafeína que pode ser encontrada no chá preto, visto que alguns estudos demonstraram que a mesma é o principal agente antifúngico contra *Monacrosporium ambrosium*, fungo fitopatógeno que acomete a planta *C. sinensis*. Além disso, clones da planta com maior quantidade de cafeína são mais eficazes na inibição do crescimento do fungo (KUMAR; HEWAVITHARANAGE; ADIKARAM, 1995; JAYARATNA; KARUNARATNE; KUMAR, 2009).

Outro fator que explica a atividade das infusões é a sua composição química, pois muitos compostos do chá estão relacionados à atividade antifúngica. Estudo de Sitheeque et al (2009) demonstrou atividade antifúngica de quatro concentrações de catequinas e teaflavinas, isoladas do chá preto, sobre o crescimento de cinco espécies de *Candida*. Outro estudo demonstrou que digalato de teaflavina foi capaz de inibir o crescimento de *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* (OKUBO et al, 1991). Além disso, destacam-se os estudos referentes à ECGC, como por exemplo, o estudo de Park et al (2006), o qual mostrou atividade

antifúngica de ECGC sobre 21 isolados clínicos de sete diferentes espécies de *Candida*, sendo *C. glabrata* que apresentou maior sensibilidade. Ainda, Evensen et al (2009) verificaram a ação de ECGC sobre a formação de biofilme por *C. albicans* e obtiveram redução de 75% de viabilidade celular.

Neste estudo observou-se que tanto chá preto quanto o chá branco não foram capazes de inibir a formação de tubo germinativo, o que poderia estar relacionado a um possível mecanismo de ação. Pesquisas nesse sentido com alguns compostos isolados do chá, já vem sendo realizadas, como o estudo de Han (2007a), o qual demonstrou que ECGC é capaz de inibir a formação de hifas de *C. albicans*. No entanto, o estudo de Navarro-Martinez (2006) demonstrou que o possível mecanismo de ação antifúngica de ECGC é sua ação anti-folato, interferindo dessa maneira, na via de biossíntese do ergosterol. Outro estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura avaliou o efeito de catequinas e teaflavinas sobre células de leveduras e demonstrou consideráveis danos na parede celular fúngica (SITHEEQUE et al, 2009).

O presente estudo avaliou o efeito da combinação do chá branco ou chá preto com AmB e observou que a atividade encontrada, em algumas das cepas testadas, é considerada, de acordo com os FICIs, aditiva. Apesar de o chá preto apresentar maior atividade antifúngica, o efeito aditivo com AmB foi encontrado em um maior número de cepas com o chá branco. Este resultado pode estar relacionado ao maior conteúdo de catequinas monoméricas encontradas no chá branco, como por exemplo, a ECGC. Este composto, além de possuir atividade antifúngica, se mostrou agir sinergicamente com AmB contra *C. albicans* em estudos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, os animais tratados com a combinação apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente maior do que os animais tratados somente com AmB (HAN, 2007a). Em outros estudos, ECGC também apresentou atividade antifúngica sinérgica com AmB e fluconazol em cepas de *C. albicans* sensíveis e resistentes aos dois antifúngicos (NAVARRO-

MARTINEZ; CANOVAS; RODRIGUEZ-LOPEZ, 2006; HIRASAWA; TAKADA, 2004). O mecanismo pelo qual a AmB e catequinas atuam na célula fúngica pode estar relacionado ao fato de que a AmB em concentrações abaixo da concentração fungicida mínima aumenta a permeabilidade da membrana celular da levedura, o que leva a um aumento na entrada de catequinas na célula (HIRASAWA; TAKADA, 2004).

Não há relatos do efeito do chá preto e de seus compostos isolados sobre a atividade da AmB, no entanto, atividade antifúngica sinérgica do chá preto com antibióticos, como o cloranfenicol, gentamicina, metilicina e ácido nalidíxico, foi descrita em cepas de bactérias enteropatogênicas (TIWARI et al, 2005).

Neste estudo observou-se que o efeito aditivo foi encontrado em apenas algumas cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, e *C. parapsilosis*. Isto sugere que o efeito aditivo pode estar limitado a espécies específicas, devido à padrões de susceptibilidade variados para cada espécie. A diversidade genética dentro e entre as diferentes espécies analisadas também devem ser considerada. O estudo de Sitheeque et al (2009) também demonstrou essa variação de susceptibilidade entre e intra espécies, no que se refere à atividade antifúngica de catequinas e teaflavinas. *C. glabrata* mostrou-se a mais sensível, seguida de *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. O mesmo estudo observou variações significativas de sensibilidade entre cepas de mesma espécie para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

## **5.2 Atividade citotóxica *in vitro* sobre hemáceas**

As hemáceas têm sido utilizadas como sendo um bom modelo para estudo de toxicidade, principalmente das novas formulações de AmB que estão sendo desenvolvidas atualmente. Estudos demonstram que lipossomas e nanopartículas contendo AmB oferecem um efeito protetor às hemáceas quando comparados à AmB livre em ensaios de citotoxicidade. No

entanto, a utilização dessas formulações na prática clínica é limitada, devido o alto custo (IMAN et al, 2011; JUNG et al, 2009).

Nesse sentido, este estudo demonstrou uma alternativa para redução da toxicidade da AmB, através da combinação desta com o chá preto ou chá branco. Os resultados obtidos mostram que os chás não são tóxicos frente às hemáceas e mostram um efeito protetor da toxicidade, visto que houve redução da hemólise induzida pela anfotericina quando esta foi associada tanto com chá preto quanto com o chá branco. Brajtburg et al (1985) sugerem o dano oxidativo como componente no efeito anticelular e, particularmente, na ação lítica da AmB, pois demonstraram que a hemólise induzida pela droga foi retardada na presença do antioxidante catalase, enquanto que a aceleração da lise foi evidenciada na presença de pró-oxidantes como o ascorbato. Desse modo, sugere-se que o efeito protetor observado neste estudo para o chá branco e preto pode estar relacionado a mecanismos antioxidantes, visto que essa atividade é bem estabelecida e estudada dentre os chás de *C. sinensis*. Essa hipótese é reforçada por estudo de Halder e Bhaduri (1998), os quais demonstraram que o chá preto e catequinas foram capazes de proteger hemáceas humanas da lise induzida por diferentes promotores de dano oxidativo, como a fenilhidrazina, cobre e sistema xantina/xantina oxidase. O estudo mostrou que o chá preto preveniu completamente a peroxidação lipídica, impediu a degradação de proteínas de membrana e restaurou a organização da membrana das hemáceas. Outro efeito protetor semelhante foi observado por Grinberg et al (1997), os quais observaram que polifenóis do chá preto protegiam eritrócitos do dano oxidativo e lise induzidos por primaquina.

Outros efeitos de proteção de toxicidade pelo chá de *C. sinensis* são descritos, como por exemplo, em estudos com modelo animal em que o chá preto protege células hepáticas e eritrócitos das mudanças estruturais de membrana que ocorrem na intoxicação por etanol (DOBRZYNSKA et al, 2005; SZACHOWICZ-PETELSKA et al, 2011)

### **5.3 Atividade citotóxica *in vitro* sobre LPMN**

A busca pela redução da citotoxicidade da AmB levou ao desenvolvimento de estudos que utilizaram o LPMN como modelo celular. Marzullo et al (1997) descreveram uma emulsão rica em triglicérides que associada à AmB reduz a queda na viabilidade celular de LPMNs induzida pela droga. Outro estudo *in vitro* demonstrou o efeito protetor do colesterol contra a toxicidade induzida por AmB em LPMNs, devido à competição entre colesterol da membrana leucocitária e colesterol livre, pela ligação com a droga (CHUNN; STARR; GILBERT, 1977).

Este estudo avaliou o efeito do chá branco e preto sobre a toxicidade induzida por AmB e a toxicidade dos mesmos em LPMN. Não há estudos acerca da citotoxicidade do chá preto e branco nestas células, nem do efeito destes sobre a toxicidade da anfotericina. Apesar dos chás não apresentarem efeito protetor sobre as células, observou-se que tanto chá preto quanto chá branco não foram tóxicos para os LPMN em concentrações acima das CIMs encontradas no teste de sensibilidade antifúngica.

### **5.4 Atividade citotóxica *in vitro* sobre células Vero**

Sabe-se que o principal efeito colateral da AmB é a nefrotoxicidade, fator que contribui para a elevação nas taxas de mortalidade associadas à terapêutica antifúngica (BATES et al, 2001; ULLMANN et al, 2006). Diante disso e da conhecida atividade antioxidante dos chás de *C. sinensis*, avaliou-se o efeito da combinação da AmB com chá preto ou branco sobre a toxicidade em células Vero. O ensaio visou explorar mais um benefício desta associação e propor uma nova alternativa para minimizar o efeito nefrotóxico, visto que várias estratégias já utilizadas na tentativa de reduzir a toxicidade da droga, como por exemplo, o prolongamento do tempo de infusão, a administração conjunta de manitol, além de novas formulações de anfotericina são por vezes ineficazes e de alto custo. (ERIKSSON; SEIFERT; SCHAFFNER 2001; MISTRO et al, 2012

No entanto, os resultados demonstraram que os chás não protegem as células Vero da toxicidade induzida pela AmB. Não há estudos a cerca da citotoxicidade do chá preto e branco nestas células, nem do efeito destes sobre a toxicidade da AmB. Embora, estudos mostraram que preparações de *C. sinensis*, bem como compostos isolados do chá contribuíram para redução de toxicidade renal induzida por gentamicina, tacrolimus em modelo celular *in vitro*, além de contribuir na redução da nefropatia diabética induzida por estreptozotocina em modelo animal (HISAMURA et al, 2008; RENNO et al, 2008; SALEM et al, 2010). Além disso, no estudo realizado por Odabasi et al (2009) utilizando N-acetilcisteína, composto que também apresenta ação antioxidante, demonstrou redução da nefrotoxicidade e do apoptose induzida por AmB em células tubulares renais.

## 6. CONCLUSÕES

- i) O chá preto e chá branco mostraram atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* sp testadas, sendo que o chá preto foi o que demonstrou maior atividade;
- ii) A interação da combinação do chá preto ou chá branco de *C. sinensis* com anfotericina B frente a cepas de referência (coleção ATCC) de *Candida* sp, bem como a cepas de origem clínica, foi do tipo adição.
- iii) Chá Preto e chá branco protegem hemáceas humanas da toxicidade da anfotericina B, através da inibição de hemólise induzida pela droga;
- iv) Chá preto e chá branco não exercem efeito protetor sobre a toxicidade induzida por anfotericina B em leucócitos polimorfonucleares e células Vero.

## 7. REFERÊNCIAS

ABEYWICKRAMA, K.R.W.; RATNASOORIYAB, W.D.; AMARAKOON, A.M.T. Oral hypoglycaemic, antihyperglycaemic and antidiabetic activities of Sri Lankan Broken Orange Pekoe Fannings (BOPF) grade black tea (*Camellia sinensis* L.) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 135, p. 278-286, 2011.

ALMAJANO, M.P.; CARBO, R.; JIMENEZ, L.A.J.; GORDON, H.M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. v. 108, p. 55-63, 2008.

AN, M.; SHEN, H.; CAO, Y.; ZHANG, J.; WANG, Y.; JIANG, R.; Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 33, p. 258-263, 2009.

ANANDHAN, A.; TAMILSELVAM, K.; RADHIGAA, T.; RAO, S.; ESSA, M.M.; MANIVASAGAM, T. Theaflavin, a black tea polyphenol, protects nigral dopaminergic neurons against chronic MPTP/probenecid induced Parkinson's disease. *Brain Research*. v.1433, p. 104-113, 2012.

ARIKAN, S.; LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.; REZ J.H. In Vitro Synergy of Caspofungin and Amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.46, p. 245-247, 2002.

ARTHUR, R.R.; DREW, H.R.; PERFECT, J.R. Novel modes of antifungal drug administration. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. v. 13, p. 903-932, 2004.

BAGNIS, C.I.; DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. v.13, p. 481-491, 2002.

BAHORUN, T.; RAMMA, A.L.; BHUJUN, N.S.V.; GUNNESS, K.T.; GOOGOLY, K.; AUGER, C.; CROZIER, A.; ARUOMA, I.O. The effect of black tea on risk factors of cardiovascular disease in a normal population. *Preventive Medicine*. (2012) (in press) doi:10.1016/j.ypmed.2011.12.009.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. v.78, p. 431-441, 2005.

BANCIROVA, M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*. v.43, p. 1379-1382, 2010.

BANCIROVA M. Black and green tea - Luminol false-negative bloodstains detection. *Science & Justice* (2011) (in press) doi:10.1016/j.scijus.2011.07.006.

BANDYOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, T.K.; DASGUPTA, A.; LOURDURAJA, J.; DASTIDAR, S.G. *In Vitro* and *In Vivo* Antimicrobial Action of Tea: The Commonest Beverage of Asia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v. 28, p. 2125-2127, 2005.

BATES, D.W.; SU, L.; YU, D.T.; CHERTOW, G.M.; SEGER, D.L.; GOMES, D.R.; DASBACH, E.J.; PLATT, R. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clinical Infectious Diseases*. v. 32, p. 686-693, 2001.

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

BENNETT, J.E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.; MEDOFF, G.; SANDE, M.A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B.T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MCGEE, Z.A.; CATE, T.R.; COBBS, C.G.; WARNER, J.F.; ALLING, D.W. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *The New England Journal of Medicine*. v.19, p.126-131, 1979.

BENNETT, J.E. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *The New England Journal of Medicine*. v. 355, p. 1154-1159, 2006.

BETTS, J.W.; KELLY, S.M.; HASWELL, S.J. Antibacterial effects of theaflavin and synergy with epicatechin against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 38, p. 421-425, 2011.

BOGGS, J.M.; CHANG, N.H.; GOUNDALKAR, A. Liposomal amphotericin B inhibits *in vitro* T-lymphocyte response to antigen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 35, p. 879-885, 1991.

BOWDEN R.; CHANDRASEKAR P.; WHITE, M.H.; LI, X.; PIETRELLI, L.; GURWITH.; VAN BURIK, J.A.; LAVERDIERE, M.; SAFRIN, S.; WINGARD, JR. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases*. v. 35, p. 359-366, 2002.

BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S.; ELBERG, S.; FINEGOLD, C. Permeabilizing and hemolytic action of large and small polyenes in human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.18, p. 586-592, 1980.

BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; SCHWARTZ, D.R.; CROQUIN, V.A.; SCHLESSINGER, D.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Involvement of Oxidative Damage in Erythrocyte Lysis Induced by Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 27, p. 172-176, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Pneumologia Sanitária. Controle da Tuberculose: diretrizes do plano de ação emergencial para municípios prioritários, Brasília, 1997.

BRUIN, E.A.; ROWSON, M.J.; BUREN, V.; RYCROFT, J.A.; OWENB, G.N. Black tea improves attention and self-reported alertness. *Appetite*. v.56, p. 235-240, 2011.

BURGESS, B.L.; CAVIGIOLIO, G.; FANNUCCHI, M.V.; ILLEK, B.; FORTE, T.M.; ODA, M.N. A phospholipid–apolipoprotein A-I nanoparticle containing amphotericin B as a drug

delivery platform with cell membrane protective properties. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 399, p. 148–155, 2010.

CAMARGO, L.E.A. Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, 2011.

CAFFREY, P; LYNCH, S; FLOOD, E; FINNAN, S; OLIYNYK, M. “Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes,” *Chemistry and Biology*. v.8, p. 713-723, 2001.

CIZ, M.; LOJEK, A. Improved dextran preparation of human leucocytes for chemiluminescence analysis of the oxidative burst of polymorphonuclear cells. *Clinical and Laboratory Haematology*. v.19,p. 49-51, 1997.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; CHEW, Y.L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*. v.102, p. 1214-1222, 2007.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; CHONG, K.L.; TAN, J.B.L.; WONG, S.K. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*. v.23, p. 185-189, 2010.

CHEN, D.L.; FEINGOLD, D. Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 13, p. 914-917, 1978.

CHOW, J.W.; YU, V.L. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 11, p. 7-12, 1999.

CHOW, S.H.H.; HAKIM, I.A. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacological Research*. v. 64, p.105-112, 2011.

CHUNN, J.C.; STARR, P.R.; GILBERT, D.N. Neutrophil Toxicity of Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 12, p. 226-230, 1977.

CIMPOIU, C.; CRISTEA, V.M.; HOSU, A.; SANDRU, M.; SESERMAN, L. Antioxidant activity prediction and classification of some teas using artificial neural networks. *Food Chemistry*. v.127, p. 1323-1328, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, 3<sup>rd</sup> ed., M27-A3. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, PA. 2008.

COLOMBO, A.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.36, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUER, A.S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a

nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, p. 2816-2823, 2006.

CONSOLARO M.E., ALBERTONI T.A., SVIDZINSKI A.E., PERALTA R.M., SVIDZINSKI T.I.: Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. v.159, p. 501-507, 2005.

COOPER, R.; MORRÉ, J.; MORRÉ, D.M. Medicinal benefits of green tea: part I. review of non cancer health benefits. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. v. 11, p. 521-528, 2005.

CUI, Y.; OHB, Y.J.; LIMA, J.; YOUNA, M.; LEEC, I.; PAK, H.K.; PARKE, W.; JOB, W.; PARKA, S. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food Microbiology*. v. 29, p. 80-87, 2012.

CYBUISKA, B.; MAZERSI, J.; BOROWSKI, E.; GARY-BOBO, G.M. Haemolytic activity of aromatic heptaenes, a group of polyene antifungal antibiotics. *Biochemical Pharmacology*. v. 33, p. 41-46, 1984.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N.L.; FUENTEFRIA, A.M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 47, p. 33-38, 2011.

DOBZYNSKA, I.; PETELSKA, S.B.; OSTROWSKA, J.; SKRZYDLEWSKA, E.; FIGASZEWSKI, Z. Protective effect of green tea on erythrocyte membrane of different age rats intoxicated with ethanol. *Chemico Biological Interactions*. v. 156, p. 41-53, 2005.

DRUMMOND, D.C.; WONG, C.W.; WHITMAN, L.M.; McCORMACK, J.G. The effects of amphotericin B, fluconazole and miconazole on neutrophil and lymphocyte function in a guinea pig model. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 36, p. 375-384, 1995.

ERIKSSON, U.B.; SEIFERT, B.; SCHAFFNER, A. Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial. *British Medical Journal*. v. 322, p. 579-582, 2001.

ENDO, H.E. Efeito antifúngico de extrato bruto e frações de *Punica granatum* contra *Candida albicans* e sinergismo com fluconazol. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 2007.

ELLIS D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.49, p. 7-10, 2002.

EVENSEN, N.A.; BRAUN, P.C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 55, p. 1033-1039, 2009.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*. v.109, p. 69-75, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. v.2, p. 207, 2010.

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). II *Fármaco*. v.56, p. 397-401, 2001.

FILIPPIN, F.; SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.42, p. 167-194, 2006.

FORREST, G.I.; BENDALL, D.S. The Distribution of Polyphenols in the Tea Plant(*Camellia sinensis* L.) *Biochemical Journal*. v.113, p. 741-755, 1969.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; LEVIN, C.E.; MANDRELL, R.E.; KOZUKUE, N. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. v. 69, p. 354-361, 2006.

GHANNOUM, A.A.; RICE, B.L. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. v.12, p. 501-517, 1999.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; PORTUGAL, H. Potentiation of Antifungal Activity of Amphotericin B by Essential Oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytotherapy Research*. v. 20, p. 58-61, 2006.

GODOIN, A.; GRUSU, D.; STEWART, D.; McDOUGALL, G. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Research International*. v.43, p. 1537-1544, 2010.

GOLD, N.; STOUT, H.A.; PAGANO, J.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vivo* studies. *Antibiotics annual*. v. 1, p. 579-586, 1956.

GONDIM, B.A.; DOLINGER, D.B.; BRITO, C.S.; DOLINGER, E.J.O.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO, P.P.F. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida não-albicans* em neonatos críticos. *Arquivos de Ciências da Saúde*. v.16, p. 105-109, 2009.

GRAY, K.C; PALACIOS, D.S; DAILEY, I; ENDO, M.M; UNO, B.E; WILCOCK, B.C; BURKE, M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2012) (in press) doi:10.1073/pnas.1117280109/-/DCSupplemental.

GRECO, W. R., G. BRAVO, AND J. C. PARSONS. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*. v.47, p. 331-385, 1995.

GRINBERG, L.N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIM, E.; CHEWION, M.; RACHMILEWITZ, E.A. Protective Effects of Tea Polyphenols against Oxidative Damage to Red Blood Cells. *Biochemical Pharmacology*. v.54, p. 973-978, 1997.

HACHEM, R.; BAHNA, P.; HANNA, H.; STEPHENS, L.C.; RAAD, I. EDTA as an adjunct antifungal agent for invasive pulmonary aspergillosis in a rodent model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.50, p. 1823-1827, 2006.

HALDER, J.; BHADURI, A.N. Protective Role of Black Tea against Oxidative Damage of Human Red Blood Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.244, p. 903-907, 1998.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Medical Mycology*. v.38, p. 355-362, 2000.

HAN, Y. Synergic Anticandidal Effect of Epigallocatechin-*O*-gallate Combined with Amphotericin B in a Murine Model of Disseminated Candidiasis and Its Anticandidal Mechanism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v.30, p. 1693-1696, 2007a.

HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine*. v.14, p. 733-738, 2007b.

HAN, Y.; LEE, J.H. Berberine Synergy with Amphotericin B against Disseminated Candidiasis in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v. 28, p. 541-544, 2005.

HASLAM, E. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry*. v.64, p. 61-73, 2003.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.53, p. 225-229, 2004.

HISAMURA, F.; KOJIMA-YUASA, A.; HUANG, X.; KENNEDY, O.D.; MATSUI-YUASA, I. Synergistic Effect of Green Tea Polyphenols on Their Protection Against FK506-Induced Cytotoxicity in Renal Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, v.36, p. 615-624, 2008.

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

HORN, D.L.; NEOFYTOS D.; ANAISSIE E.J.; FISHMAN J.A.; STEINBACH W.J.; OLYAEI A.J.; MARR K.A.; PFALLER M.A.; CHANG C.H.; WEBSTER K.M. Clinical characteristics of 2,019 patients with candidemia: data from the PATH Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*. v. 48, p. 1695-1703, 2009.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J. DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol- containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical Journal*. v.83, p. 3245-3255, 2002.

IMAN, M; HUANG, Z; SZOKA, C.F; JAAFARI, R.M. Characterization of the colloidal properties, in vitro antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glycero-phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*. v.408, p.163–172, 2011.

ISLAM, S. Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine*. v.19, p. 25-31, 2011.

JAYARATNA, N.B.; KARUNARATNE, D.N.; KUMAR, N.S. Effects of caffeine and a tea flavanoid on *Monacrosporium ambrosium*, ectosymbiote of shot-hole borer beetle of tea. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. v.37, p. 273-275, 2009.

JIANHUA, W.; HAI, W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. *Journal of Medical Colleges of PLA*. v.24, p. 142-147, 2009.

JUNG, S.H.; LIM, S.H.; JUNG, S.H.; JUNG, E.L.; JEONG, K.S.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Science*. v.37, p. 313-320, 2009.

KABBAR, N.; LACROIX C.; PEFFAULT L.R.; SOCIE G.; GHANNOUM M.; RIBAUD P. Breakthrough *C parapsilosis* and *C guilliermondii* bloodstream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica*. v. 93, p. 639-640, 2008.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *The International Journal of Antimicrobial Agents*. v.27, p. 12-16, 2006.

KNOPIK-SKROCKA, A.; BIELAWSKI, J. The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cellular and Molecular Biology Letters*. v.7, p. 31-48, 2002.

KNOPIK-SKROCKA, A.; BIELAWSKI J. Differences in amphotericin B induced hemolysis between human erythrocytes obtained from male and female donors. *Biology Letters*. v. 42, p. 49-60, 2005.

KNOPIK-SKROCKA, A.; BIELAWSKI, J.; KOPCZYŃSKI, Z.; GRODECKA-GAZDECKA, S.; TOMCZAK, P.; GRYCZKA, R.; MAZUR-ROSAK, M.; KÊSA, H. The susceptibility to amphotericin B-induced hemolysis of erythrocytes from women with breast cancer before and during therapy. *Comparative Clinical. Pathology*. v.15, p. 181-187, 2006.

KITAMURA, M.; NISHINO, T.; OBATA, Y.; FURUSU, A.; HISHIKAWA, Y.; KOJI, T.; KOHNO, S. Epigallocatechin gallate suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Chemico-Biological Interactions*. v.195, p. 95-104, 2012.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP M.C.; HESLET L.; KNUDSEN J.D. 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clinical Infectious Diseases*. v.42, p. 938-944, 2006.

KRUEGER, K.E.; GHOSH A.K.; KROM B.P.; CIHLAR R.L. Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiology*. v.150, p. 229-240, 2004.

KUMAR, S.N.; HEWAVITHARANAGE, P.; ADIKARAM, N.K.B. Attack on tea by *Xyleborus forficatus*: Inhibition of the symbiont *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. *Phytochemistry*. v.40, p. 1113-1116, 1995.

KURTZAMAN, C.P.; FELL, J.M.; BOEKHOUT, T. The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier Science. v. 2, p. 987, 2011.

LACAZ, C.S.; SAMPAIO, S.A.P. Tratamento da Blastomicose Sul- Americana com Anfotericina B. Resultados Preliminares. Revista Paulista de Medicina. v. 52, p. 443-450, 1958.

LAI, C.C.; TAN, C.K.; HUANG, Y.T.; SHAO, P.L.; HSUEH, P.R. Current challenges in the management of invasive fungal infections. Journal of Infection and Chemotherapy. v. 14, p. 77-85, 2008.

LAMY-FREUND, T.M.; SCHREIER, S.; PEITZSCH, R.M.; REED, W.F. Characterization and time dependence of amphotericin B: deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. The Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 80, p. 262-266, 1991.

LANIARDO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: Side effects and toxicity. Revista Iberoamericana de Micologia. v.26, p. 223-227, 2009.

LASS-FLÖRL, C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. Drugs. v. 71, p. 2405-2419, 2011.

LEGRAND, P.; ROMERO, E.A.; COHEN, B.E.; BOLARD, J. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 36, p. 2518-2522, 1992.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O. Amphotericin B. Applied Microbiology and Biotechnology. v.68, p. 151-162, 2005.

LEWIS, R.E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. Mayo Clinic Proceedings. v.86, p. 805-817, 2011.

LIMA, J.D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W.S.; SILVA, R.B. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. Ciência Rural. v.39, p. 35-39, 2009.

LINGEGOWDA, B.P.; TAN, K.C.; TAN, L.A.; TAN H.B. Selection of Resistant Fungi in Liver Transplant Recipients During Use of Newer Antifungal Agents — A Report of Two Cases. The official Medical Journal of the Academy of Medicine. v. 40, p. 287-290, 2011.

MANIR, M.; KIM, J.K.; LEE, B.G.; MOON, S.S. Tea Catechins and Flavonoids from the Leaves of *Camellia sinensis* Inhibit Yeast Alcohol Dehydrogenase, Bioorganic & Medicinal Chemistry. (2012) (in press) doi: 10.1016/j.bmc.2012.02.002.

MARCOS, A; FISCHER, A; REA, G; HILL, S.J. Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine geographical origin of tea. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. v.13, p. 521-525, 1998.

MARR, K.A.; CRIPPA, F.; LEISENRING, W.; HOYLE, M.; BOECKH, M.; BALAJEE, S.A.; NICHOLS, W.G.; MUSER, B.; COREY, L. Itraconazole versus fluconazole for prevention of fungal infections in patients receiving allogeneic stem cell transplants. Blood. v. 103, p. 1527-1533, 2004.

MARZZULLO, L.; SOUZA, L.C.; CAMPA, A. Effect of amphotericin B associated with a lipid emulsion on the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. *General Pharmacology*. v. 27, p. 203-207, 1997.

MISTRO, S.; MACIEL, I.M.; DE MENEZES, R.G.; MAIA, Z.P.; SCHOOLEY, R.T.; BADARÓ, R. Does Lipid Emulsion Reduce Amphotericin B Nephrotoxicity? A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. v. 54, p.1774-1777, 2012.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.48, p.17-20, 2006.

MENEZES, P.F.C.; BAGNATO, V.S.; JOHNKE, R.M.; BONNERUP, C.; SIBATA, C.H.; ALLISON, R.R.; PERUSSI, J.R. Photodynamic therapy for Photogem and Photofrin using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. *Laser Physics Letters*. v. 4, p. 546-551, 2007.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A.L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine*. v.347, p. 2020-2029, 2002.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.19, p.110-115, 2009.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *The Journal of Immunological Methods*. v.65, p.55-63, 1983.

MURDOCH, D.R. Microbiological patterns in sepsis: what happened in the last 20 years. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 34, p. 5-8, 2009.

NAVARRO-MARTINEZ, M.D.; CANOVAS, F.G.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 57, p. 1083-1092, 2006.

NETO, M.M.; COSTA, R.S.; REIS, M.A.; GARCIA, T.M.P.; FERRAZ, A.S.; SABER, L.T.S.; BATISTA, M.E.P.N.; MUGLIA, B.V.; FIGUEIREDO, J.F.C. Candidíase em pacientes transplantados renais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.30, p. 485-491, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, C. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. v.70, p. 461-477, 2007.

NIE, S.P.; XIE, M.Y. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. *Food Hydrocolloids*. v.25, p. 144-149, 2011.

ODABASI, Z.; KARAALP, A.; CERMIK, H.; MOHR, J.; TIGEN, E.T.; KOC, M.; KORTEN, V. Reduction of Amphotericin B-Induced Renal Tubular Apoptosis by *N*-Acetylcysteine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 53, p. 3100-3102, 2009.

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

OKAMOTO, Y. AOKI, S. MATAGA I. Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. *Mycopathologia*. v.158, p. 9-15, 2004.

OKUBO, S.; TODA, M.; HARA, Y.; SHIMAMURA T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against *Trichophyton*. *Nihon Saikingaku Zasshi*. v.46, p. 509-514, 1991.

PAGANO L, CAIRA M, VALENTINI CG, POSTERARO B, FIANCHI L. Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Blood Review*. v. 24, p. 51-61, 2010.

PANDEY, B.K.; RIZVI, S.I. Upregulation of erythrocyte ascorbate free radical reductase by tea catechins: Correlation with their antioxidant properties. *Food Research International*. v. 46, p. 46-49, 2012.

PARK, B.J.; PARK J-C.; TAGUCHI, H.; FUKUSHIMA, K.; HYON, TAKATORI, K.; Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 347, p. 401-405, 2006.

PATEL, R. Antifungal agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clinic Proceedings*. v. 73, p. 1205-1225, 1998.

PEREIRA, A.V.; ALMEIDA, T.C.; BELTRAME, F.L.; COSTA, M.E.; GARRIDO, L.H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chá verde e preto – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Scientiarum Health Sciences*. v. 31, p. 119-124, 2009.

PERLROTH J.; CHOI B.; SPELLBERG B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*. v. 45, p. 321-346, 2007.

PETELSKA, S.B.; SKRZYDLEWSKA, E.; FIGASZEWSKIA, Z. Protective effect of black tea on integral membrane proteins in rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology*. (2011) (in press) doi:10.1016/j.etp.2011.08.003.

PETERSON, J.; DWYER, J.; BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D.; HOLDEN, J.; ELDRIDGE, A.L.; BEECHER, G.; ALADESANMI, J. Major flavonoids in dry tea. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 18, p. 487-501, 2005.

PFALLER M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases*. v. 22, p. 89-94, 1996.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; EDMOND, M.B.; WENZEL RP. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of

occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. v. 31, p. 327-332, 1998.

PFALLER M.A.; DIEKEMA D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 20, p.133-63, 2007.

PFALLER M.A.; MOET J.G.; MESSER A.S.; JONES N.R.; CASTANHEIRA M. *Candida* Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. v. 55, p. 561-566, 2011.

PFALLER M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. v. 125, p. 3-13, 2012.

PHILIPS, H.J. Dye exclusion test for viability, In: Kruse Jr, P.F.; Patterson, Jr. M. H.; *Tissue Culture: methods and application*. Academic Press. v.1, p. 406-408, 1973.

POLYCHRONOPOULOS E.; ZEIMBEKIS A.; KASTORINI C.M.; PAPAIRAKLEOUS N.; VLACHOU I.; BOUNTZIOUKA V.; PANAGIOTAKOS D.B. Effect of black and green tea consumption on blood glucose levels in non-obese elderly men and women from mediterranean islands (medis epidemiological study). *The European Journal of Nutrition*. v.47, p. 10-16, 2008.

PRENTICE A.G; GLASMACHER A. Making sense of itraconazole pharmacokinetics. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. v. 56, p. 17-22, 2005.

PUPULIN, Á.R.T.; CARVALHO, P.G.; NISHI, L.; NAAMURA, C.V.; FALAVIGNA, G.A.L. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 42, p. 551-555, 2009.

RACIS, S.P; PLESCIA, O.J.; GELLER, H.M.; SCHAFFNER, C.P. Comparative toxicities of amphotericin B and its monomethyl ester derivative on glial cells in culture. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 34, p. 1360-1365, 1990.

RENNO, W.M.; ABDEEN, S.; ALKHALAF, M.; ASFAR, S. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *British Journal of Nutrition*. v.100, p. 652-659, 2008.

RENTZ A.M.; HALPERN M.T.; BOWDEN R. Impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clinical Infectious Diseases*. v. 27, p.781-788, 1998.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALLEZZANO, L.; MALAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. v. 15, p. 635-638, 2008.

RUSAC, G.; KOMES, D.; LIKIC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*. v.110, p. 852-858, 2008.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUIA, N.E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii*

and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine*. v.17, p. 1057-1060, 2010.

SAITO, S.T.; FROELICH, P.E.; GOSMANN,G.; BERGOLD, A.M. Full validation of a simple method for determination of catechins and caffeine in Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) using HPLC. *Cromatographia*. v.65, p. 607-610, 2007.

SALEM, E.A.; SALEM, N.A.; KAMEL, M.; MAAROUF, A.M.; BISSADA, N.K.; HELLSTROM, W.J.G.; ELADL, M. Amelioration of gentamicin nephrotoxicity by green tea extract in uninephrectomized rats as a model of progressive renal failure. *Renal Failure*. v.32, p.1210-1215, 2010.

SANG, S.; LAMBERT, J.D.; HO, C.T.; YANG, C.S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological Research*. v. 64, p. 87-99, 2011.

SAVILLE, S.P.; LAZZELL, A.L.; MONTEAGUDO, C.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. *Eukaryotic Cell*. v.2, p. 1053-1060, 2003.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; DUARTE, A.; MENDONC, D.I.; DOMINGUES, F.C. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. v.19, p. 42– 47, 2011.

SILVA, M.M.C.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA,L.M.; CUSTODIO, J.B.A.; Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1464, p. 41-61, 2000.

SILVA, M.M.C.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M.; CUSTODIO, J.B.A. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicology in Vitro*. v.15, p. 612-615, 2001.

SITHEEQE, M.A.; PANAGODA, G.J.; YAU, J.; AMARAKOON, A.M.; UDAGAMA, U.R.; SAMARANAYAKE, L.P. Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy*. v. 55, p. 189-196, 2009.

SCHOLEY, A.; DOWNEY, L.A.; CIORCIARI, J.; PIPINGAS, A.; NOLIDIN, K.; FINN, M.; WINES, M.; CATCHLOVE, S.; TERRENS, A.; BARLOW, E.; GORDON, L.; STOUGH, C. Acute neurocognitive effects of epigallocatechin gallate (EGCG). *Appetite*. v. 58, p. 767-770, 2012.

SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*. v. 42, p. 529-535, 2009.

SOBEL J.D. The emergence of non-*albicans Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Current Infectious Disease Reports*. v. 8, p. 427-33, 2006.

SONG, Y.A.; PARK, Y.L.; KIM, K.Y.; CHUNG, C.Y.; LEE, G.H.; CHO, D.H.; KI, H.S.; PARK, K.J.; CHO, S.B.; LEE,W.S.; KIM, N.; AHN, B.W.; JOO, Y.E. Black tea extract prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappa B signaling and attenuates dextran sulfate

sodium-induced experimental colitis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11:91, 2011.

SPADER, TB.; VENTURINI, T.P.; CAVALHEIRO, A.S.; MAHL, C.D.; MARIO, D.N.; LARA, V.M.; SANTURIO, J. ALVES, S.H. In vitro interactions between amphotericin B and other antifungal agents and rifampin against *Fusarium* spp. *Mycoses* v 54, p.131–136, 2009.

STERLING, T.R.; MERZ W.G. Resistance to amphotericin B: emerging clinical and microbiological patterns. *Drug Resistance Updates*. v.1, p. 161-165, 1998.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. v. 4, p. 369-376, 2004.

SUPAPIDHAYAKUL, S.R.; KIZLAITIS, R.L.; ANDERSEN, R.B. Stimulation of Human and Canine Neutrophil Metabolism by Amphotericin B. v.19, p. 284-289, 1981.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F. O. CALIXTO, I. A. R. L.; LORENZI, H.; MELHEM, M. S. C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.103, p. 443-449, 2008.

THANGAPAZHAM, R.L.; SINGH, A.K.; SHARMA, A.; WARREN, J.; GADDIPATI, J.P.; MAHESHWARI, R.K. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*. v. 245, p. 232-241, 2007.

TIWARI, R.P.; BHARTI, S.K.; KAUR, H.D.; DIKSHIT, R.P.; HOONDAL, G.S. Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*. v. 122, p. 80-84, 2005.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARICHI, E.M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K.G.; SORDA, M.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 45, p.1843-1850, 2007.

UCHIYAMA, S.; TANIGUCHI, Y.; SAKA, A.; YOSHIDA, A.; YAJIMA, H. Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition*. v. 27, p. 287-292, 2011.

ULLMANN, A.J.; SANZ, M.A.; TRAMARIN, A.; BARNES, R.A.; WU, W.; GERLACH, B.A.; KROBOT, K.J.; GERTH, W.C.; LONGITUDINAL EVALUATION OF ANTIFUNGAL DRUGS (LEAD I) INVESTIGATORS. Prospective study of amphotericin B formulations in immunocompromised patients in 4 European countries. *Clinical Infectious Diseases*. v.43, p. 29-38, 2006.

VARTIVARIAN, E.S.; ANAISSIE, E.J.; BODEY, G.P. Emerging Fungal Pathogens in Immunocompromised Patients: Classification, Diagnosis, and Management. *Clinical Infectious Diseases*. v. 17, p. 487-491, 1993.

VANDEPUTTE, P; FERRARI, S; COSTE T.A. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. (2012) (in press) doi:10.1155/2012/713687

VENTURINI, T.P.; ROSSATO, L.; SPADERA, T.B.; TRONCO-ALVES, G.R.; AZEVEDO, M.I.; WEILERA, C.B.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.71, p.126–130, 2011.

WALSH, T.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D.; PAPPAS, P.; SEIBEL, N.; GREENBERG, R.N.; DUMMER, S.; SCHUSTER, M.; HOLCENBERG, J.S. Liposomal amphotericin B por empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *The New England Journal of Medicine*. v. 340, p. 764-771, 1999.

WARN, P.A.; SHARP, A.; GUINEA, J.; DENNING, D.W. “Effect of hypoxic conditions on in vitro susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against *Aspergillus* and *Candida*,” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 53, p.743-749, 2004.

WEISBURGER, J. Tea and health: a historical perspective. *Cancer letters*. v. 114, p. 315-317, 1997.

WENZEL RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases*. v. 20, p.1531-1534, 1995.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, Cellular, and Molecular factors that Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 11, p. 382-402, 1998.

WILSON L.S.; REYES C.M.; STOLPMAN M.; SPECKMAN J.; ALLEN K.; BENEY J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value in Health*. v. 5, p. 26-34, 2002.

WINN, W.JR.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Koneman – Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1211, 2008.

WU, F.; SUN, H.; KLUZ, T.; CLANCY, A.H.; KIOK, K.; COSTA, M. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 258, p.166-175, 2012.

XU, R.; SUN, H.Y.Y.; TU, Y.; ZENG, X. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*. (2011) (in press) doi:10.1016/j.fct.2011.10.047

XU, X., ZHOU, D.X., WU, D.C. The Tea Catechin Epigallocatechin Gallate Suppresses Cariogenic Virulence Factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. v. 55, p.1229-1236, 2011.

YANG, C.S; WANG, X.; LU, G.; PICINICH, S.C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*. v.9, p. 429-439, 2009.

YANG, C.S; WANG, H.; LI, X.G.; YANG, Z.; GUAN, F.; JIN, H. Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*. v. 64, p.113-122, 2011.

YANG, J.; LI, L.; TAN, S.; JIN, H.; QIU, J.; MAO, Q.; LI, R.; XIA, C.; JIANG, Z.H.; JIANG, S.; LIU, S. A natural theaflavins preparation inhibits HIV-1 infection by targeting the entry step: Potential applications for preventing HIV-1 infection. *Fitoterapia*. v. 83, p. 348-355, 2012.

YOUNG, L.Y.; HULL, C.M.; HEITMAN, J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 47, p. 2717-2724, 2003.

ZHENG, J.; LEE, H.C.M.; SATTAR, M.M.B.; HUANG, Y.; BIAN, J.S. Cardioprotective effects of epigallocatechin-3-gallate against doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *European Journal of Pharmacology*. v. 652, p. 82-88, 2011.

ZHONG, Y.; MAB, C.M.; SHAHIDIA, F. Antioxidant and antiviral activities of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives. *Journal of Functional Foods* (2011) doi:10.1016/j.jff.2011.08.003

ZHONG A, Y.; CHIOU, Y.S.; PAN, M.H.; HOC, C.T.; SHAHIDIA, F. Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in mice. *Journal of Functional Foods*. (2012) (in press) doi:10.1016/j.jff.2011.12.011

## 8. ANEXO I



## Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COMEP/UNICENTRO/G

Ofício nº 094/2012 - COMEP/UNICENTRO/G

Guarapuava, 24 de abril de 2012.

Senhor Professor,

1. Comunicamos que o seu projeto de pesquisa intitulado: “Compostos naturais e anfotericina B: atividade antifúngica sinérgica e citotoxicidade”, folha de rosto nº 457692 parecer 193/2011 foi analisado e considerado **APROVADO ad referendum** do Comitê de Ética em Pesquisa de nossa Instituição, em 24 de abril de 2012.
2. Em atendimento ao Ofício Circular 017/2011 CONEP/CNS/MS informamos que é **obrigatória a rubrica em todas as páginas do TCLE** pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelos pesquisadores. As referidas assinaturas deverão ser apostas no fim de cada página.
3. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao COMEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
4. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
  - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao COMEP assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.
  - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao COMEP em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
5. **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do COMEP.

Pesquisador: Emerson Carraro  
Atenciosamente,

Prof. Sueli Godoi  
Coordenadora do COMEP/UNICENTRO/G  
Port. Nº 2.053/2010 – GR/UNICENTRO

AO Senhor  
Prof. Emerson Carraro  
Departamento de Farmácia - DEFAR/G  
UNICENTRO

Home Page: <http://www.unicentro.br>

**Campus Santa Cruz:** Rua Salvatore Renna – Padre Salvador, 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR

**Campus CEDETEG:** Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR

**Campus de Irati:** PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR