UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

RENATA SAYURI IWAZAKI

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE BERBERINE AND ITS SYNERGISM WITH FLUCONAZOLE

MARINGÁ – PR
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

RENATA SAYURI IWAZAKI

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE BERBERINE AND ITS SYNERGISM WITH FLUCONAZOLE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

Orientadora:

Prof[a] Dr[a] Lourdes Botelho Garcia

MARINGÁ – PR

2008

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais Nestor e Dirce, aos meus queridos irmãos, Adriano, Ricardo, Rafael e ao meu querido namorado Rafael.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, pelo eterno amor e por manter viva a fé que tem me sustentado em todos os momentos de minha existência.

Ao meu pai Nestor, exemplo de honestidade e perseverança, pela educação, formação e confiança em mim depositadas.

À minha mãe Dirce, exemplo de força e integridade, pelo imenso amor, carinho, compreensão e incansável dedicação ao longo de toda a minha vida.

Aos meus amados irmãos Adriano, Ricardo e Rafael por estarem sempre prontos a me ajudar, por torcerem pelo meu sucesso e felicidade, por tanto carinho, amor, amizade e grande incentivo.

Ao meu namorado Rafael, por estar presente em todos os momentos especiais de minha vida, pela força e generosa contribuição para que este curso fosse concluído, pela cumplicidade e pela amizade incondicional.

Aos meus queridos familiares e amigos, que compreenderam a importância deste objetivo, acreditaram e torceram pela conquista deste tão esperado momento.

À Profª. Drª. Lourdes Botelho Garcia, exemplo de profissionalismo, pela orientação, pela dedicação, amizade e confiança em nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho pelas sugestões e correções realizadas no capítulo II deste trabalho, pelo apoio científico e pelas palavras amigas nos momentos oportunos.

Aos funcionários, alunos e professores do Laboratório de Microbiologia Básica pelo auxílio técnico, pelo acolhimento e disposição em ajudar.

Aos colegas de turma do curso de pós-graduação, pelas experiências trocadas e pela convivência ao longo desse período.

À coordenação, docentes e secretária do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, pelo grande incentivo à pesquisa e pelo apoio sempre que foi necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO 2
1.1 Produtos bioativos originados de plantas 2
1.2 Berberina 4
1.3 Antifúngicos 5
1.4 Gênero *Candida* 6
1.5 Combinações antimicrobianas para tratamento de infecções fúngicas 7
2. JUSTIFICATIVA 9
3. OBJETIVO 9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 10

CAPÍTULO II

ABSTRACT 18
INTRODUCTION 18
MATERIALS AND METHODS 20
Antifungals 20
Disk diffusion assay 20
Checkerboard 20
Scanning electron microscopy 21
RESULTS AND DISCUSSION 21
ACKNOWLEDGEMENTS 24
REFERENCES 25

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES 36
PERSPECTIVAS FUTURAS 36

ANEXO

EXPERIMENTOS ADICIONAIS 38
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO 41

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos bioativos originados de plantas

Plantas produzem de centenas a milhares de compostos químicos diversos com diferentes atividades biológicas (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991). Em geral, as plantas têm grande habilidade em sintetizar compostos aromáticos, sendo a maioria metabólitos secundários que, em muitos casos, atuam no sistema de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros, e também contra o estresse físico, originado por raios ultravioleta e calor. Outros compostos químicos conferem odor, pigmentação ou sabor à planta (COWAN, 1999). Os metabólitos secundários constituem uma fonte de substâncias bioativas e, o interesse científico nesses vem aumentando devido à busca por novas drogas originadas de plantas (KUETE et al., 2006).

Na história da humanidade, as plantas são uma das fontes valiosas de produtos naturais para a manutenção da saúde humana, sendo utilizadas como alternativa para o tratamento de várias doenças (ELOFF, 1998). Estima-se que existam, no planeta, entre 250.000 e 500.000 espécies de plantas, das quais menos de 10% investigadas fitoquímica e biologicamente (COWAN 1999; CECHINEL & YUNES, 1998). Através dos tempos, o homem busca, na natureza, as fontes básicas para alimentação, moradia, vestuário, transporte, prevenção ou tratamento de doenças. Assim, umas das formas mais antigas de prática medicinal é a utilização de plantas como medicamentos. Nos dias de hoje, as plants permanecem como principal recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos, que, mesmo não compreendendo racionalmente a ação destes remédios, conhecem, por experiência, a eficácia das plantas contra doenças (GURIB-FAKIM, 2006).

Mesmo com a evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, há ainda obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, desde o acesso aos serviços hospitalares à obtenção de exames e medicamentos, o que, associados à fácil obtenção e tradição no uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JR et al., 2005).

No mundo, e especialmente na América do Sul, as plantas medicinais são utilizadas na atenção primária à saúde. No Brasil, muitas plantas são empregadas na forma de extratos brutos, infusões ou emplastros. O provável sucesso terapêutico deve-se a informações empíricas e subjetivas da medicina folclórica Mesmo com o desenvolvimento de estudos sobre as propriedades das plantas, ainda faltam evidências laboratoriais e clínicas sobre eficácia e segurança do uso de seus produtos (YUNES &CECHINEL FILHO, 2001).

O potencial de cura de infecções através do uso de plantas sempre foi uma idéia bem aceita pelo homem (RÍOS & RECIO, 2005). As populações de países como Brasil, Cuba e México apresentam tradição no uso de plantas como antimicrobianos, fato que é favorecido pela grande diversidade da flora existente nesses países (MARTÍNEZ et. al., 1996).

Um importante fator que estimula a pesquisa de novas drogas com atividade antimicrobiana é o surgimento de resistência dos microrganismos para as drogas já existentes. Esta resistência está relacionada à plasticidade genética dos microrganismos, promovida pelas mutações e pelas aquisições de novos genes, e a expressão de resistência aos antimicrobianos acaba sendo uma conseqüência do uso desses agentes no tratamento de infecções que auxiliam na sobrevivência destes em ambientes hostis (HANCOCK, 1997; GHANNOUM & RICE, 1999). Assim, novos agentes antimicrobianos são necessários, em decorrência da emergência de patógenos multi-resistentes em nosso meio. Entretanto, apesar dessa necessidade, o desenvolvimento de novos antimicrobianos está decrescendo, principalmente por ser menos viável

economicamente que o investimento em outras classes de drogas, como por exemplo, aquelas destinadas ao tratamento contínuo de doenças mais prevalentes na população idosa. Além disso, as terapias antimicrobianas em geral não são prolongadas (SPELLBERG et al., 2004).

O desenvolvimento de novos antimicrobianos se faz necessário não só para combater patógenos primários multi-resistentes, mas prevenir e controlar infecções de pacientes com comprometimento imunológico, seja por transplante de órgãos, uso de quimioterápicos, ou por doenças como a AIDS, causadas por patógenos oportunistas com resistência a múltiplos antimicrobianos (SNOECK, 2000).

1.2 Berberina

Berberina é um alcalóide de planta com uma longa história de uso na medicina chinesa. Está presente em *Hydrastes canadensis, Coptis chinesis, Berbeus aquifolium, Berberis vulgaris, e Berberis aristata*. O alcalóide berberina pode ser encontrado nas raízes, rizomas e casca das plantas. Extratos de berberina e decocção têm demonstrado significante atividade antimicrobiana contra bactérias, incluindo clamídias, vírus, fungos, protozoários e helmintos. Atualmente, o predominante uso clínico da berberina inclui tratamento de diarréias bacterianas, infecções intestinais parasitárias e infecções oculares como o tracoma (BIRDSALL & KELLY, 1997).

Berberina tem demonstrado um número de outros efeitos benéficos, incluindo imunoestimulação via fluxo sangüíneo aumentado no baço, ativação dos macrófagos, elevação do número de plaquetas em casos de trombocitopenia primária e secundária, e aumento da excreção de bilirrubina conjugada na hiperbilirrubinemia experimental (BIRDSALL & KELLY, 1997). Adicionalmente, a berberina pode possuir propriedades anti-tumorais como evidenciados pela inibição da transcrição da COX-2 e atividade N-acetiltransferase no cólon e traços celulares

cancerígenos na bexiga (LIN et al, 1999; FUKUDA et al, 1999), e transitória, mas marcada, ação inibitória no crescimento de sarcoma em ratos e em cultura de células (CREASEY, 1979).

As ações farmacológicas da berberina incluem inibição metabólica de certos organismos, inibição da formação de enterotoxinas bacterianas, inibição de acúmulo de fluídos intestinais e secreção de íons, inibição da contração do músculo liso, redução da inflamação, inibição da agregação plaquetária, elevação do número de plaquetas em certos tipos de trombocitopenia, estimulação da bile e secreção de bilirrubina, e taquiarritmias ventriculares (BIRDSALL & KELLY, 1997; AKHTER et al, 1979).

Berberina tem demonstrado fraca atividade contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*.(NAKAMOTO et al., 1990; PARK et al., 1999; VOLLEKOVA et al., 2003) Recentemente, a associação de berberina com anfotericina B foi utilizada para tratar candidíase disseminada em camundongos (HAN & LEE, 2005)

1.3 Antifúngicos

Em geral, poucos agentes antimicrobianos estão disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, principalmente devido à natureza eucariótica das células e conseqüente dificuldade em identificar alvos específicos que não acarretem danos as células do hospedeiro. Assim, o manejo das infecções causadas por fungos fica limitado por problemas como segurança, eficácia e resistência microbiana. A emergência das infecções fúngicas provocada principalmente pela imudeficiência associada a infecções pelo vírus HIV e à terapia imunossupressora estimulam pesquisas em busca de novos agentes antifúngicos, porém esse processo é lento.

Em relação ao mecanismo de ação dos antifúngicos, os derivados de polienos complexam-se ao ergosterol formando um poro através da membrana, alterando a permeabilidade e causando liberação de conteúdo celular. Entre eles estão a nistatina e a anfotericina B que, por sua vez, apresenta pouca habilidade em diferenciar o ergosterol da membrana fúngica do colesterol da membrana da célula do hospedeiro, causando toxicidade. Os derivados dos azóis possuem três gerações que compõem a maior classe de antifúngicos em uso. A primeira é representada pelos imidazóis (cetoconazol), a segunda pelos triazóis (fluconazol, itraconazol) e a terceira, pelos novos derivados triazólicos (voriconazol, posaconazol). Os azóis atuam na via biossintética do ergosterol, que é o maior componente da membrana celular fúngica, e, conseqüentemente, alteram a permeabilidade e fluidez da membrana fúngica (ODDS et al., 2003; NAILOR & SOBEL, 2006).

1.4 Gênero *Candida*

Espécies do gênero *Candida* estão presentes na microbiota humana, podendo ser encontradas no trato gastrintestinal de 20 a 80% dos indivíduos adultos saudáveis. Geralmente são comensais, tornando-se patogênicas para hospedeiros susceptíveis. As infecções mais frequentes são superficiais, como vaginites, sapinho e esofagite. Entretanto, em pacientes com sério comprometimento imunológico, como aqueles infectados pelo vírus HIV, transplantados e sob terapia antineoplásica., podem causar infecções sistêmicas severas.Leveduras do gênero *Cândida* são responsáveis por aproximadamente 80% das infecções fúngicas em ambiente hospitalar. Embora C. albicans seja a espécie mais freqüentemente isolada, o número de casos de infecções por outras espécies como C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. guilliermondii, C. lusitaniae vem aumentando. (ALBERTSON et al., 1996; MORSCHAUSER, 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; ONYEWU et al., 2003; NAVARRO-MARTÍNEZ et al., 2006).

Um fator que também contribui para a severidade das infecções oportunistas causadas por *Cândida* sp é o desenvolvimento de resistência aos agentes antifúngicos (LUPETTI et al., 2002). Os antifúngicos têm alvos celulares que quando atingidos comprometem o crescimento ou a própria sobrevivência dos fungos. Estes, por sua vez, têm a habilidade de superar a ação inibitória dos antifúngicos (WHITE et al.,, 1998). A resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos pode ser primária ou intrínseca quando ocorre previamente à exposição à droga, e secundária ou adquirida quando se desenvolve com exposição ao agente antifúngico, e, neste caso, pode ser reversível. *C albicans* e espécies relacionadas podem se tornar resistentes aos antifúngicos através da redução no acúmulo intracelular da droga, devido aos sistemas de efluxo ativo, alterações na estrutura ou concentrações alvo, e alterações na composição de esterol de membrana (SANGLARD& ODDS, 2002).

Infecções por *Candida* sp representam um desafio para os clínicos. Estudos epidemiológicos demonstram que as infecções causadas por esses microrganismos vem aumentando constantemente devido a um manejo mais agressivo da medicina atual. (BECK-SAGUÉ & JARVIS, 1993),

1.5 Combinações de antimicrobianos para tratamento de infecções fúngicas

Combinações antimicrobianas são empregadas na tentativa de evitar a emergência de resistência, ou em casos de infecção polimicrobiana, ou ainda para diminuir a toxicidade de uma das substâncias sem comprometer a ação antimicrobiana. Interações entre diferentes drogas podem gerar os efeitos descritos como aditivo, indiferença, antagonismo e sinergismo (Elliopoulos & Moellering 1996).

O efeito aditivo ocorre quando o resultado da combinação é igual à soma dos resultados de cada substância separadamente. A indiferença ocorre quando o resultado da combinação não difere do resultado obtido com a substância mais efetiva isoladamente. Antagonismo ocorre quando o resultado da atividade antimicrobiana da combinação é menor do que a resposta aditiva; e sinergismo: ocorre quando o resultado da combinação é maior que a resposta aditiva. Este efeito resulta em maior atividade antimicrobiana do que aquela esperada para cada substância individualmente, ou seja, um aumento no efeito terapêutico.

Para antimicrobianos, a utilização de combinações duplas ou triplas começa com testes in vitro que demonstram interações positivas com inibição do crescimento do microrganismo. Os ensaios de combinações de drogas utilizando a técnica de difusão em ágar possibilitam testar um grande número de compostos tanto para atividade intrínseca como em combinação com outra substância, utilizando para tanto, ágar com concentração determinada de droga (MARCHETTI et al., 2000). Outro método, que é mais comumente utilizado para avaliar a combinação é o “checkerboard”, uma extensão do método de microdiluição em caldo onde cada poço contém uma combinação única de concentrações diferentes das drogas testadas, no qual se determina a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do crescimento microbiano (ELIOPOULOS, 1996).

Há trabalhos sobre sinergismo entre fluconazol e agentes como ibuprofeno, salicilato de sódio, propilparabeno, verapramil, progesterona, ciclosporina, FK506 e berberina, atuando contra espécies do gênero *Candida* sp (SCOTT et al., 1995; MARCHETTI et al., 2000; PINA-VAZ et al., 2005; QUAN et al., 2006). Agentes como citocinas, peptídeos antimicrobianos e agentes antibacterianos podem representar candidatos em potencial para tratamentos em combinação com antifúngicos padrões como anfotericina B e fluconazol (LUPETTI et al., 2003).

Alguns mecanismos propostos para o sinergismo antifúngico são: (i) inibição em diferentes etapas da mesma via biossintética; (ii) maior penetração de um agente antifúngico devido a ação sobre parede ou membrana do outro agente; (iii) inibição simultânea em diferentes alvos fúngicos (JOHNSON et al., 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A combinação na terapia antifúngica ganhou maior importância nas últimas três décadas. Estudos focados neste tipo de terapia são baseados em: mecanismos de ação, combinando agentes com alvos de ações complementares; espectro de ação, combinando agentes potentes contra diferentes organismos; e estabilidade e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (MUKHERJEE et al., 2005). Os possíveis benefícios incluem amplo espectro de eficácia, maior potência que qualquer uma das drogas em monoterapia, maior segurança e tolerabilidade, e redução no número de organismos resistentes (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2001).

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica da berberina, e de sua combinação com fluconazol, sobre o crescimento, morfologia celular, formação de tubo germinativo e capacidade de aderência ao vidro de amostras de *Candida* albicans.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, G. D., NIIMI, M., CANNON, R. D., JENKINSON, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v.40, n.12, p. 2835-2841, 1996.

AKHTER, M. H., SABIR, M., BHIDE, N. K. Possible mechanism of antidiarrhoeal effect of berberine. *The Indian Journal Medical Research*, New Delhi v. 70, p. 233-241, 1979.

BECK-SAGUÉ, C. M., JARVIS, W. R., And the National Nosocomial Infection Surveíllance syste. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1880-1990. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 167, nº 5, p. 1247-1251, 1993

BIRDSSAL, T. C., KELLY, G. S. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alternative Medicine Review*, Idaho v. 2, p. 94-103, 1997.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, São Paulo, v.21, n. 21, p.99-105, 1998.

COLOMBO, A. L., GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por Candida spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CREASEY, W. A., Biochemical effects of berberine. *Biochemical Pharmacology*, Oxford v. 28, p. 1081-1084, 1979.

ELIOPOULOS, G. M., MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinatios. In: Lorian V. (Ed), Antibiotics in laboratory medicine, 4 ed, Willians and Wilkins, Baltimore, 1996.

ELOFF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 60, p. 1-8, 1998.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, Oxford, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAMBURGER, M. HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, New York, v. 30, p.3864-3874, 1991.

HAN, Y., LEE, J. H. Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biological Pharmaceutical Bulletin*., Tokyo, v.28, p.541-544, 2005.

HANCOCK, R. E. W. Peptides antibiotics. *The Lancet*, London, v.349, p. 418-422, 1997.

JOHNSON, M. D., MACDOUGALL, C., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PERFECT, J. R., REX, J. H. Combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KUETE, V., NGUEMEVING, J. R., BENG, V. P., AZEBAZE, A. G. B., ETOA, F. X., MEYER, M., BODO, B., NKENGFACK, A. E. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from Vismia laurentii De Wild (Gutiferae). *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 2006.

LEWIS, R. E., KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy*, Boston, 21, p. 149S-165S, 2001.

LUPETTI, A., DANESI, R., CAMPA, M., DEL TACCA, M., KELLY, S. Molecular basis of resistanse to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine*, Oxford, v.8, n.2, 2002.

LUPETTI, A., NIBBERING, P. H., CAMPA, M., DEL TACCA, M., DANESI, R. Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations. *Trends in Molecular Medicine*, Oxford, v. 9, n. 6, p. 269-276, 2003.

MARCHETTI, O., MOREILLON, P., GLAUSER, M. P., BILLE, J., SANGLARD, D. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 44, n. 9, p. 2373-2381, 2000.

MARTÍNEZ, M.J., BETANCOURT, J., ALONSO-GONZÁLEZ, N., JÁUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 52, p.171-174, 1996.

MORSCHAUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1587, p 240-246, 2002.

MUKHERJEE, P. K., SHEEHAN, D. J., HITCHCOCK, C. A., GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 18, n. 1, p. 163-194, 2005.

NAILOR, M. D., SOBEL, J. D. Progress in antifungal therapy: echinocandins versus azoles. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, Amsterdam, New York, v. 3, n. 2, p.221-226, 2006.

NAKAMOTOM K., SADAMORI, S., HAMADA, T. Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi. *Journal of Prosthetic Dentistry*, St. Louis, v.64, p.691-694, 1990.

NAVARRO-MARTÍNEZ, M. D., CABEZAS-HERERA, J., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Antifolates as antimicotics: connection between the folic acid cycle and the ergosterol biosíntesis pathway in Candida albicans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 560-567, 2006.

ODDS, F. C., BROWN, A. J. P., GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanism of action. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

ONYEWU, C.; BLAKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin *inhibitors against Candida albicans, Candida glabrata and Candida krusei. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 47, n 3, p. 956-964, 2003.

PARK, K. S., KANG, K. C., KIM, J. H., ADAMS, D. J., HOHNG, T.N., PAIK, Y. K. Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosynthesis in *Candida albicans. Journal of antimicrobial Chemotherapy*, London, 43, p. 667-674, 1999.

PINA-VAZ, C., RODRIGUES, A. G., OLIVEIRA, S. C., RICARDO, E., MARDH, P. A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on Candida resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, 56, p. 678-685, 2005.

QUAN, H., CAO, Y. Y., XU, Z. ZHAO, J. X., GAO, P. H., QIN, X. F., JIANG, Y. Y. Potent in vitro synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 50, n. 3, p. 1096-1099, 2006.

RÍOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* , Limerick, v.100, p.80-84, 2005.

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

SCOTT, E. M., TARIQ, V. N., McCRORY, R. M. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against Candida albicans in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 39, n. 12, p. 2610-2614, 1995.

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 16, p. 157-159, 2000.

SPELLBERG B., POWERS, J. H., BRASS, E. P., MILLER, L. G., EDWARDS Jr, J. E. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 38, p. 1279-1286, 2004.

VEIGA Jr, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VOLLEKOVA, A., KOST'ALOVA, D., KETTMANN, V., TOTH, T. Antifungal activity of Mahonia aquifolium extract and its major protoberberine alkaloids. Phytotherapy Research. Chichester, v. 17, p.834-837, 2003.

WHITE, T. C., MARR, K. A., BOWDEN, R. A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 2, p.382-402, 1998.

YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna.* Chapecó: Argos 2001, p. 17-46.

CAPÍTULO II

Antifungal activity of the Berberine and its synergism with Fluconazole

Antifungal activity of the Berberine

Renata Sayuri Iwazaki[1], Eliana Harue Endo[2], Tânia Ueda-Nakamura[2], Celso Vataru Nakamura[2], Lourdes Botelho Garcia[2] and Benedito Prado Dias Filho[2*]

[1]Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas
[2]Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil

[*] Corresponding author (phone: + 55-44-32614955; Fax: + 55-44-32614860; postal address: Av. Colombo, 5790, CEP 87920-900, Maringá, PR, Brazil; e-mail: bpdfilho@uem.br)

Excluído: ¶

Excluído: **Abstract¶**
¶
Berberine with and without fluconazole was tested by an agar disk diffusion assay in which clinical isolates of *Candida albicans* were applied onto yeast extract-peptone-dextrose agar plate. Berberine which had no intrinsic antifungal activity at the concentration tested, exerted a powerful antifungal activity in combination of fluzonazole. Combinations of berberine and fluconazole were also tested by the checkerboard assay to determine whether they had favorable or unfavorable antifungal interactions. The MIC of fluconazol was 1.9 µg/ml when the drug was tested alone and decreased to 0.48 µg/ml in the presence of berberine concentrations of 1.9 µg/ml. However, berberine at concentrations of >1.9 µg/ml combined with a fluconazole supra-MIC (i.e., >1.9 µg/ml) eliminated the residual turbidity (trailing) in the incubation wells. This observation made it possible to use a different endpoint, the MIC-0. The MICs-0 for yeast were graphed in isobolograms and yielded highly concave curve, characteristic of strong drug synergism. Electron micrographs were taken to determine if any structural changes took place in *C. albicans* after treatment with berberine alone and in combination with fluconazole Cells exposed to berberine in combination with fluconazole were already very altered. They were collapsed and showed deep surface folds. Some of them also showed clear degradations and appeared surrounded by cellular debr ... [1]

CAPÍTULO III

Conclusões

Os resultados obtidos de em nosso estudo demonstram que a combinação de berberina com fluconazol produziu um efeito inibitório sinérgico sobre o crescimento de *C. albicans*, além de profundas alterações celulares.

Perspectivas futuras

Considerando que um importante mecanismo de resistência fúngica ao fluconazol ocorre através do sistema de efluxo ativo ou bombas de efluxo, que diminui a concentração do agente no interior da célula, pretendemos, futuramente, avaliar a atividade da berberina no sistema de bombas de efluxo, na tentativa de elucidar o mecanismo de potencialização do efeito inibitório quando combinada com fluconazol.

ANEXOS

Experimentos adicionais

1. Avaliação do efeito da berberina e do fluconazol sobre a formação de tubo germinativo em *C. albicans*

Colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud foram transferidas para uma solução salina 0,9% estéril para se obter turvação idêntica àquela comparada ao tubo 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC/ml). Um volume de100 µl de soro fetal bovino (SFB) foi colocado em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, 100 µl de berberina 1000 µg/ml foram adicionados ao primeiro poço, a partir do qual, foram realizadas diluições seriadas (500 a 7,8 µg/ml). Em cada um dos poços, 10 µl da suspensão de leveduras foram adicionados. A placa foi incubada a 37°C durante 3 horas, com leve agitação. O mesmo procedimento foi realizado com berberina (500 a 7,8 µg/ml) associada ao fluconazol (62,5 µg/ml). Em seguida, as células foram observadas em microscópio óptico invertido (Zeiss Axiovert 25) para determinar o efeito da berberina sobre a formação do tubo germinativo. Controles negativos foram feitos com nistatina (62,5 µg/ml) e fluconazol (62,5 µg/ml). Cultura de *C. albicans* sem tratamento foi utilizada como controle positivo do experimento (Figura 1).

2. Avaliação do efeito da berberina e do fluconazol sobre a aderência de *C. albicans* em lamínula de vidro

Volumes de 500 µl de suspensões contendo $1x10^6$ UFC/ml de *C. albicans* tratadas com diferentes concentrações de berberina (500 a 7,8µg/ml) e fluconazol foram transferidos para uma placa de 24 poços contendo uma lamínula redonda em cada poço. A placa foi incubada a 37°C e, após 1hora, as lamínulas foram retiradas, lavadas com PBS pH 7,2 estéril, por três vezes e transferidas para outra placa. A avaliação qualitativa foi realizada em microscópio óptico invertido (Zeiss Axiovert 25). Suspensões de *C. albicans* sem tratamento fora utilizadas como controle.

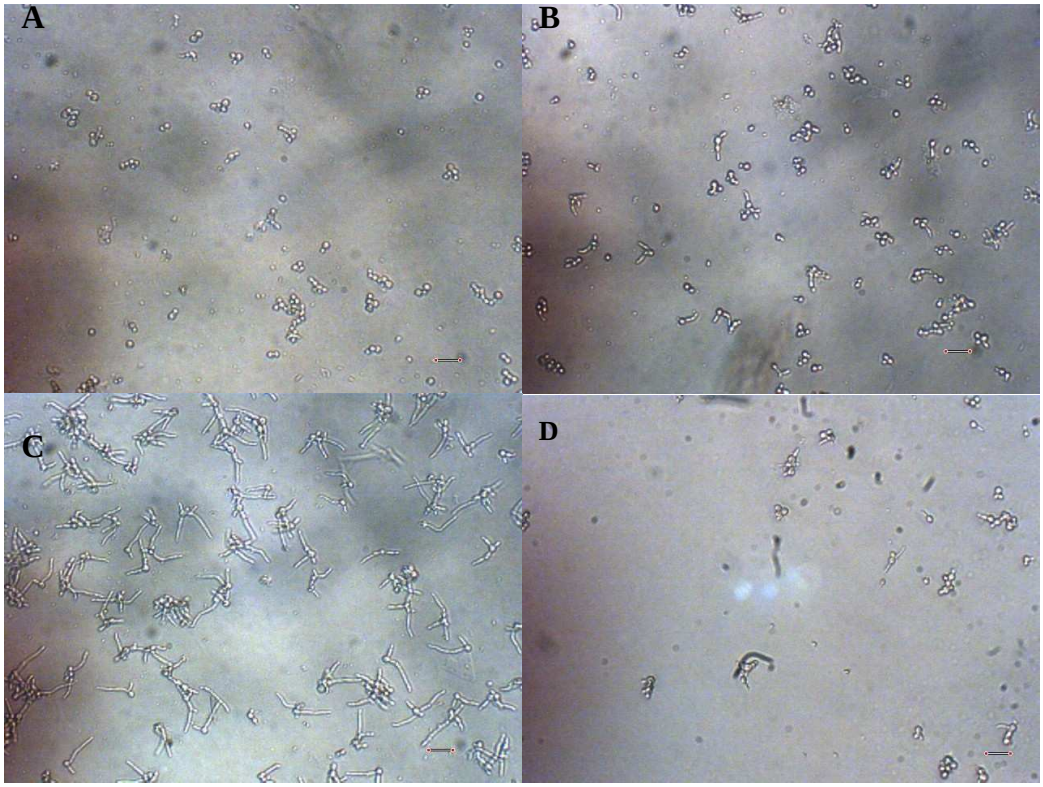


Figura 1. Ensaio de inibição do tubo germinativo. (**A)** Leveduras tratadas com 62,5 µg/ml de fluconazol. (**B)** Leveduras tratadas com 125 µg/ml de berberina. (**C)** Leveduras não tratadas. (**D)** Leveduras tratadas com a associação de berberina (125 µg/ml) e fluconazol (62,5 µg/ml). Barra: 25µm.

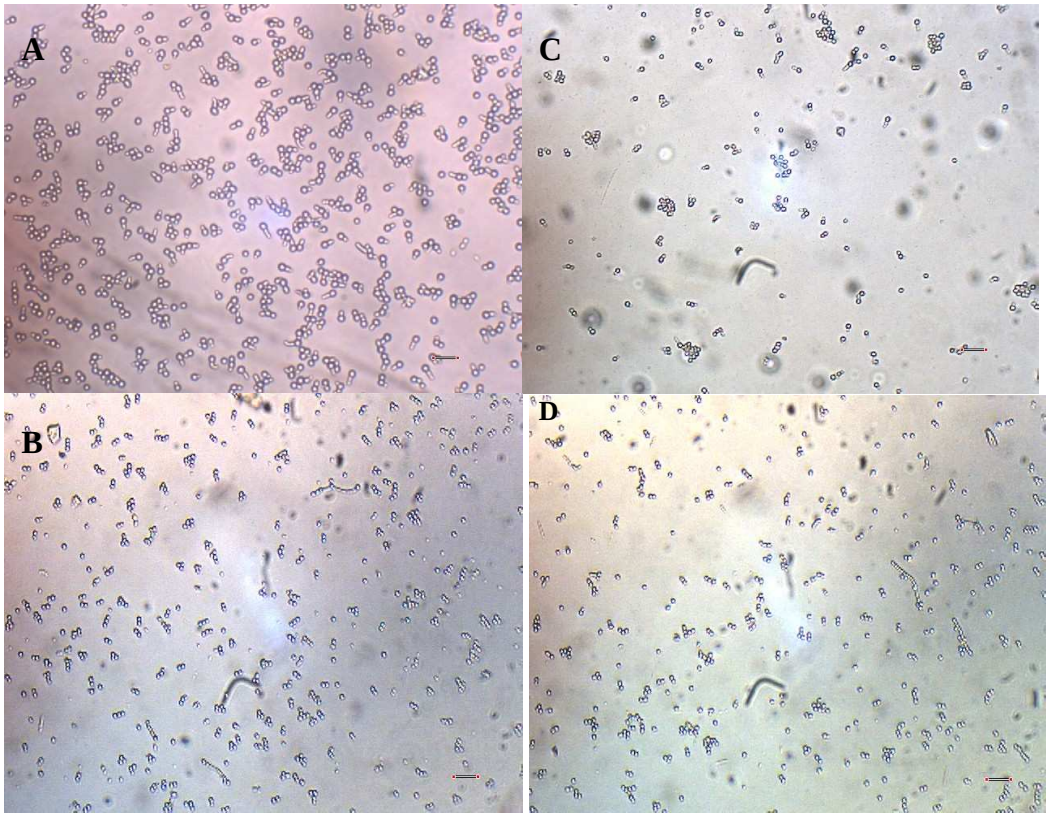


Figura 2. Aderência em lamínula de vidro. (**A)**. Células não tratadas. (**B)**. Células tratadas com 250 µg/ml de berberina. (**C)**. Células tratadas com 64µg/ml de fluconazol. (**D)**. Células tratadas com 62,5 µg/ml de berberina e 64 µg/ml de fluconazol. **.B**arra: 25µm.

Normas para publicação

Revista: ***Pharmaceutical biology***

Notice to contributors

1. Manuscripts will be considered for publication as full-length research papers, notes, or reviews. Authors wishing to prepare a review on a specific topic should contact the Editor prior to submission. As an exception, letters to the editor may be published where the situation warrants. Papers may be returned due to language deficiencies, errors in syntax, etc.
2. All units of measurement should be given in metric or SI units. Botanical and chemical nomenclature should he consistent with Index Kewensis and Appendix IV of the Chemical Abstracts 1987 Index Guide, respectively. (Note that under this treatment trivial chemical names are acceptable where they will be commonly understood.) Trivial names for enzymes may be used but the provision of the Enzyme Commission number for the enzyme is strongly recommended. Similarly, the provision of Chemical Abstracts registry numbers is encouraged. In all studies of plants or animals, specific identification should be made as to the materials used, such as by citation of voucher specimen in herbarium or other collections, quoting name of collector, collection number (or date), place of collection, etc. Unless otherwise noted, it will be understood that such specimen will be found in the author's own collection or that of the institution at which the work was done.
3. A manuscript should be submitted electronically but in rare cases where this is not possible, the typewritten paper must be double spaced, on one side of the paper, quarto size, leaving margins of 2.5 cm (1 in) on all sides. The format/style follows:

- A title page needs to be the cover page to all manuscripts. Titles should be the minimum length required to convey the objective of the paper. In addition to the title,

the title page should contain the authors' names and their complete addresses. The address of the corresponding author should be specifically marked, including the phone/fax and e-mail address. A brief running title should be provided. * An abstract page should immediately follow the title page. The abstract is to be no longer than 250 words, but should be a concise statement of the work detailed in the paper. Remember that the abstract may be all that readers will see if they are using an abstracting service such as MEDLINE, Chemical Abstracts, etc. as a way of finding relevant papers.

- A keywords page that has a list of up to 10 keywords (in alphabetical order) and separate list of the Latin binomials (with authority) of all organisms noted in the manuscript. In the body of the manuscript the first reference to any organism should include the full binomial, binomial authority, and family. * The body of the manuscript should be organized into the following sections as much as is possible:
- An introduction section should present the background and note the literature relevant to the work described. It should be as brief as possible and yet concisely state the prior history of the problems involved.
- A materials and methods section should detail, at least by reference, all of the protocols needed for other workers to duplicate the work. The purity and quality of reagents should be noted. Pharmaceutical Biology requires that an animal study must be approved by a review board, or at least in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. All antimicrobial studies must include MIC data.
- A results section should detail the outcomes of the undertakings being reported. In the case of ethnomedical papers, the results will be the information gathered. In an isolation, the results will include spectral and other details of the methods undertaken. Where biological testing is reported, the results will be noted here. -A discussion

section should conclude the manuscript by putting the results obtained into the context of the prior literature and may indicate future directions that need to be undertaken.

- Any acknowledgments the authors wish to include should be placed at the end of the body of the manuscript.
- Text citations should follow the Harvard system and thus put the last name of the first author and the year of publication within parentheses unless the author's name immediately precedes the citation [i.e. "recent work (Pezzuto, 2007)" (Pezzuto & Smith, 2005) or "recently Pezzuto et al. (2006)"].
- Figures and Tables should each be placed on separate pages. Each figure should be submitted in final (camera-ready) form. The captions for all Figures should be collected on a separate page. Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication. A quote will be provided for color art prior to publication. The publisher has the right to refuse publication of color prints deemed unacceptable.
- References should be listed alphabetically by year. Issue number required only when each issue of a volume begins with page 1. Only citations from the primary literature should be included as references. References should list all authors. Journal titles should be abbreviated according to Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI). The format for references follows:

Standard journal article:

Single author:

Addison A (1866): On the chemical pathology of the brain. J Mental Sci 12: 188-210.

McNamara JO (1994): Cellular and molecular basis of epilepsy. J Neurosci 14: 3413-3425.

Brundin L (1947): Zur Kenntnis der swedischen Chironomiden. Ark ZooI 39A(3): l21.

Multiple authors:

Sander JWAS, Hart YU, Trimble MR (1991): Vigabatrin and psychosis. J Neurol Neurosurg Psychiat 54: 435-439.

Aserinsky E, Lynch JA, Mack ME, Tzankoff SP, Hurn E (1985): Comparison of eye motion in wakefulness and REM sleep. Psychophysiology 22: 1-10.

Book:

Finger S (1994). Origins of Neuroscience. A History of Explorations into Brain Function. New York, Oxford University Press, pp. 299-315.

Chapter in Book:

Heath RG (1982): Psychosis and epilepsy: similarities and differences in the anatophysiologic substrate. In: Koella WP, Trimble MR, eds., Temporal Lobe Epilepsy. Mania and Schizophrenia and the Limbic System. Basel, Karger, pp. 106-116.

- Authors should supply copies of all manuscripts cited as in press or submitted.
- Notes should have a brief introduction and experimental section. The results and discussion may be combined and should be kept to a minimum.

4. An electronic copy of the manuscript should be submitted to:

John M. Pezzuto, Ph.D.
Professor and Dean
University of Hawaii at Hilo
College of Pharmacy
60 Nowelo St., Suite 101
Hilo, Hawaii 96720
pezzuto@hawaii.edu

5. Submission of a manuscript will be taken to imply that the work described is unpublished and not being considered for publication elsewhere. Papers published in PB may not be reprinted or published in translation without permission. Reproduction of illustrations requires similar permission.

6. The editors and publishers necessarily accept all manuscripts as the outcome of meritorious investigations and seek to review their worth through a fair and unbiased review process but cannot accept responsibility for inaccurate representation of experimental results by authors. The Editors reserve the right to refuse any manuscript submitted, whether on invitation or otherwise, and to make suggestions and modifications before publication. All corrections in proof other than printers‘ errors are at the authors’ expense. Papers returned for revision will be considered withdrawn if a revised manuscript is not received within four months.

Abstract

Berberine with and without fluconazole was tested by an agar disk diffusion assay in which clinical isolates of *Candida albicans* were applied onto yeast extract-peptone-dextrose agar plate. Berberine which had no intrinsic antifungal activity at the concentration tested, exerted a powerful antifungal activity in combination of fluzonazole. Combinations of berberine and fluconazole were also tested by the checkerboard assay to determine whether they had favorable or unfavorable antifungal interactions. The MIC of fluconazol was 1.9 µg/ml when the drug was tested alone and decreased to 0.48 µg/ml in the presence of berberine concentrations of 1.9 µg/ml. However, berberine at concentrations of >1.9 µg/ml combined with a fluconazole supra-MIC (i.e., >1.9 µg/ml) eliminated the residual turbidity (trailing) in the incubation wells. This observation made it possible to use a different endpoint, the MIC-0. The MICs-0 for yeast were graphed in isobolograms and yielded highly concave curve, characteristic of strong drug synergism. Electron micrographs were taken to determine if any structural changes took place in *C. albicans* after treatment with berberine alone and in combination with fluconazole Cells exposed to berberine in combination with fluconazole were already very altered. They were collapsed and showed deep surface folds. Some of them also showed clear degradations and appeared surrounded by cellular debris.

Key words: berberine, *Candida albicans*, checkerboard, fluconazole, synergism

Introduction

Candida species are now the fourth most common organism recovered from the blood of hospitalized patient. Notwithstanding the increasing need for effective therapy, the range of antifungal agents available is limited, and some of the most effective agents are

also toxic. In addition, while the azoles have been used successfully for the treatment of *Candida* infections, numerous reports of treatment failures are now appearing in the literature (Ko et al., 2000).

Since the lack of new classes of drugs or different molecular targets, drug combinations might be considered a strategy for therapy, concerning the multiplicity of fungal targets against which current agents are effective (Mukherjee et al., 2005). Drug interactions are described as synergistic, indifferent, additive or antagonistic. An advantage of using combination is the synergistic effect, which antifungal activity is greater than the individual contribution of each agent. Benefits include spectrum of efficacy, improved safety and tolerability and reduction of antifungal resistance (Eliopoulos & Moellering, 1996; Lewis & Kontoyiannis, 2001).

Previous reports of synergistic combinations of antifungal compounds have not been extensive or encouraging. In a review of combination therapy in systemic mycosis, Polak (1990) discussed the combination of amphotericin B with flucytosine as one of the better-established synergistic combinations of antifungal agents that has been used clinically to treat candidiasis. The combination of an azole with a polyene resulted in conflicting outcomes, depending on the species and the strain tested, and specific antagonism was observed with *Candida albicans* (Polak, 1990).

Berberine, a well-known alkaloid, was found in medicinal herbs such as *Coptis chinensis* and *Hydrastis Canadensis*. Currently, the predominant clinical uses of berberine preparations include the treatment of bacterial diarrhea, intestinal parasite infections and ocular trachoma infections (Birdsall, 1997). Berberine was demonstrated to have weak activity against *C. albicans* and *C. glabrata* (Nakamoto et al., 1990; Park et al., 1999; Vollekova et al., 2003). Other pharmacological effects of berberine, such as antiarrhythmic, anti-inflammatory, anticancer immunosuppressive, vasorelaxant and

antiproliferative have also been reported (Marinova et al., 2000; Mitani et al., 2001; Hua et al., 2007)

The main aim of the study described here was to investigate ways of enhancing the antifungal activities of the azoles. We have focused on combination of berberine with fluconazole, because fluconazole is one of the most popular drugs for treating candidiasis, especially in immunocompromised patients.

Materials and Methods

Antifungals

Berberine and fluconazole were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.)

Disk diffusion assay

C. albicans ATCC 10231 and clinical isolates were tested by disk diffusion test (MARCHETTI, 2000). A 10^6 CFU/ml yeast suspension was applied onto the yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) agar plate with and without 6 µg/ml of fluconazole using cotton swabs. Then, for *C. albicans* ATCC 10231, paper disks impregnated with 0, 1, 10, 100 and 500 µg of berberine were placed onto agar plates. For isolates, berberine was tested at 0, 10 and 100 µg/disk. Diameters of growth inhibition zones were measured after incubation at 37°C for 24h.

Checkerboard

Checkerboard tests were performed by broth microdilution reference procedure at a final inoculum of 0.5 x 10^3 to 2.5 x 10^3 CFU/ml, using RPMI 1640 medium buffered with 0.165M MOPS (CLSI, 2002). The final concentrations ranged from 0.06 to 62.5 µg/ml for fluconazole and 1.9 to 125 µg/ml for berberine. Plates were incubated at 37°C for 48h and absorbance was read in a ELISA plate reader at 492 nm. The fractional inhibitory concentration (FIC) index is the sum of the MIC of each drug in combination

divided by the MIC of the drug used alone. An FIC index ≤ 0.5 is considered synergism; FIC index > 4 is antagonism and a result > 0.5 but ≤ 4 is indifferent (ODDS, 2003).

Scanning electron microscopy

In order to investigate the effect of the berberine and fluconazole alone and in combination on morphology of *C. albicans*, treated and control cells were examined by scanning electron microscopy. Treated and untreated cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2 and small drops of the fixed cells were placed on specimen support with poly-L-lysine for 1 hour at room temperature. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical-point dried in CO_2, coated with gold and examined in a SHIMADZU SS-550 scanning electron microscope.

Results and discussion

The alkaloid berberine is a common component of a variety of plant species, particularly in the family *Berberidaceae*. Berberine exhibits relatively weak antibiotic properties, apparently because of its efflux by multidrug resistance pumps

In the present study, combinations of berberine and fluconazole were tested by an agar disk diffusion assay in which clinical isolates of *Candida albicans* were applied onto YEPD agar plate..Agar diffusion tests visualized a synergistic interaction. Berberine had no antifungal activity in smaller amounts and showed a weak antifungal activity at 500 µg (Fig 1A). Fluconazole at 6 µg/ml had no antifungal activity. In contrast, berberine showed a powerful fungistatic effect on the agar plate containing 6 µg/ml fluconazole (Fig. 1B).

To quantify the antifungal activities obtained with berberine alone and in combination with fluconazole, antifungal indices were calculated. An increase of the antifungal index reflected a synergistic effect. Table 1 summarizes the in vitro

susceptibilities of 25 isolates of *C. albicans* as determined by disk diffusion testing. Berberine alone had in this experimental setting a low intrinsic antifungal activity (median, 0.04; range, 0 to 0.2), and its combination with fluconazole had a powerful antifungal activity with a median index of 1.26 (range, 0 to 2.1).

Berberine and fluconazole were also tested by the checkerboard assay to determine whether they had favorable or unfavorable antifungal interactions. The MIC of fluconazol was 1.9 µg/ml when the drug was tested alone and decreased to 0.48 µg/ml in the presence of berberine concentrations of 1.9 µg/ml. However, berberine at concentrations of >1.9 µg/ml combined with a fluconazole supra-MIC (i.e., >1.9 µg/ml) eliminated the residual turbidity (trailing) in the incubation wells (Fig. 2A). This observation made it possible to use a different endpoint, the MIC-0. The MICs-0 for yeast were graphed in isobolograms and yielded highly concave curve, characteristic of strong drug synergism (Fig 2B).

Electron micrographs were taken to determine if any structural changes took place in *C. albicans* after treatment with berberine alone and in combination with fluconazole (Fig. 3). The control cells of *C. albicans* presented a smooth surface and sub-spherical or oval shape, with a great capacity for producing blastospores (Fig. 3A). After exposure to berberine alone, the general aspect of the cells was not modified; although, some of the yeast cells began to cluster (Fig 3B). Cells exposed to fluconazole alone were rounder and showed a tendency to agglutinate; lemon-shaped yeasts with small buds were still present, but we also observed a great capacity for producing pseudohyphae (Fig. 3C). Cells exposed to berberine in combination with fluconazole were already very altered. They were collapsed and showed deep surface folds. Some of them also showed clear degradations and appeared surrounded by cellular debris (Fig. 3D).

The results presented here indicate a strong synergistic interaction between berberine and fluconazole in inhibiting the growth of *Candida albicans*. These drugs had no intrinsic antifungal activity at the concentration tested. By checkerboard microtiter testing it was observed that supra-MIC concentrations of fluconazole had only a weak fungistatic effect, and this finding correlated well with the measured residual turbidity, the so-called trailing. However, above a given minimal concentration, berberine eliminated completely the trailing effect when combined with supra-MIC of fluconazole. The term trailing has been used to describe the reduced but persistent growth that some isolates of *Candida* spp. exhibit over an extended range of drug concentrations. For some isolates, however, trailing growth is so significant that the MICs for these isolates will appear to be low after 24h but much higher after 48h. These MICs are so discordant that they place the isolate into different MIC interpretive categories at the two time points. The reduction of trailing observed in the present study was explained by a strain-dependent potent fungistatic or fungicidal effect resulting from the combination of berberine with fluconazole. Since this effect decreased the viable counts by >99,9% compared to those of the growth control, a different endpoint, the MIC-0, was chosen.

The incidence of systemic fungal infections due to organisms that are not susceptible to commonly used antifungal agents such as fluconazole continues to increase, and the association of this phenomenon with overproduction of multidrug transporters of the ABC and Major Facilitator superfamilies is now well established (Sanglard et al., 1995; Bossche, 1998). The widely used triazole drug fluconazole usually provides treatment of these infections and has few side effects. However, prolonged administration of fluconazole in immunocompromised patients can result in the appearance of azole-resistant clinical isolates over expressing multi-drug efflux

transporters including ATP-binding cassette (ABC) transporters or major facilitator super family (MFS) transporters (White et al., 1998). Suppressing the activity of these fungal ABC transporters with small molecule multi-drug efflux pump inhibitors could reduce the drug resistance of these pathogenic fungi and therefore help to increase the efficacy of antifungal chemotherapy with triazoles. Berberine is a weak antimicrobial produced by a wide variety of plant species. It is an amphipathic cation that resembles quaternary ammonium antiseptics in its chemical properties and possibly in its mechanism of action as well. The likely targets of berberine are the cytoplasmic membrane and DNA, into which it intercalates (Jennings et al., 1983). Amphipathic cations are the preferred substrates of most multidrug resistance pumps (Lewis, 2001) Several studies have shown that plants of the genus *Berberis* (*Berberis repens*, *B. aquifolium* and *Berberis fremontii*) producing berberine synthesise two substances, the flavonolignan 5′-MHC-D and the porphyrin pheophorbide *a*, which have no antibacterial activity but have an inhibiting property against MDR efflux pumps found so far in *Staphylococcus aureus* (allowing berberine to carry out its activity) (Stermitz et al., 2000a and b; Stermitz et al, 2001). In the absence of efflux, berberine, a hydrophobic cation, accumulates in the cells of microbial pathogens, and the accumulation is driven by the membrane potential (Severina et al., 2001).

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Capacitação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (Capes), Fundação Araucária, and Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. The authors would like to thank Marinete Martinez Vicentin for skillful technical assistance.

References

Birdsall TC (1997): Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. Alternative Medicine Review 2(2): 94-103.

Bossche VH, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D (1998): Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. Medical Mycology Supplement 36(1): 119-128.

CLSI (NCCLS) (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – 2ª Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.

Eliopoulos GM, Moellering RC (1996): Antimicrobial combinations. In: Lorian V. (Ed), Antibiotics in laboratory medicine, 4 ed, Willians and Wilkins, Baltimore, pp.330-395.

Hua W, Ding L, Chen Y, Gong B, He J, Xu G (2007): Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 44 (415): 931-937.

Jennings BR, Ridler PJ (1983): Interaction of chromosomal stains with DNA. An electrofluorescence study. Biophys Struct Mech 10: 71-79.

Ko W, Yao X, Lau C, Law W, Chen Z, Kwok W, Ho K, Huang Y (2000). Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. Eur J Pharmacol 399: 187–196.

Lewis K (2001): In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. J Mol Microbiol Biotechnol 3: 247-254.

Lewis RE, Kontoyiannis DP (2001): Rationale for combination antifungal therapy. Pharmacotherapy 21: 149-164.

Marchetti O, Moreillon P, Glauser MP, Bille J, Sanglard D (2000) : Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother 44: 2373-2381.

Marinova E, Nikolova D, Popova D, Gallacher G, Ivanovska N (2000): Suppression of experimental autoimmune tubulointerstitial nephritis in BALB/c mice by berberine. Immunopharmacology 48: 9–16.

Mitani N, Murakami K, Yamaura T, Ikeda T, Saiki I (2001): Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis lung carcinoma. Cancer Lett 165: 35–42

Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA (2005): Combination treatment of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 18: 163-194.

Nakamoto K, Sadamori S and Hamada T (1990): Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi. J Prosthet Dent 64: 691-694.

Odds F (2003): Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antim Chemother 52:1.

Park KS, Kang KC, Kim JH, Adams DJ, Johng TN, and Paik YK (1999): Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in Candida albicans. J Antimicrob Chemother 43: 667-674.

Polak A (1990): Combination therapy in systemic mycosis. J Chemother 2: 211–217.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995): Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents and Chemother 39(11): 2378-2386.

Severina II, Muntyan MS, Lewis K, Skulachev VP (2001): Transfer of cationic antibacterial agents beerberine, palmatine and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and Staphylococcus aureus membrane. IUBMB-Life Sci 52: 321-324.

Stermitz FR, Beeson TD, Mueller PJ, Hsiang JF, Lewis K (2001): Staphylococcus aureus MDR efflux pump inhibitors from a Berberis and a Mahonia (sensu strictu) species. Biochem Syst Ecol 29: 793–798.

Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K (2000): Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5′-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. Proc Natl Acad Sci 97: 1433–1437.

Stermitz FR, Tawara-Matsuda J, Lorenz P, Mueller P, Zenewicz L, Lewis K (2000): 5′-Methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: Berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant Staphylococcus aureus. J Nat Prod 63: 1146–1149.

Vollekova A, Kost'alova D, Kettmann V, Toth J (2003): Antifungal activity of Mahonia aquifolium extract and its major protoberberine alkaloids. Phytother Res 17: 834-837.

White TC, Marr KA, Bowden RA (1998): Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical Microbiology Reviews11(2): 382-402.

Quebra de página

LEGEND FOR FIGURE

Fig. 1. Disk diffusion halo assays demonstrate enhanced inhibition of *C. albicans* ATCC 10231 when berberine is combined with fluconazole. A 10^6 CFU/ml yeast suspension was applied onto the yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) agar plate without (**A**) and with (**B**) 6 µg/ml of fluconazole using cotton swabs. Paper disks impregnated with 0, 1, 10, 100 and 500 µg of berberine were placed onto agar plates. Diameters of growth inhibition zones were measured after incubation at 37°C for 24h.

Fig. 2. Assessment of the in vitro interaction between berberine and fluconazole against *Candida albicans* ATCC 10231. (A) Checkerboard microtiter plate assay testing the combination of berberine with fluconazole in *C. albicans* ATCC 10231. The MIC of fluconazole was 1.9 µg/ml when the drug was tested alone and decreased to 0.48 µg/ml in the presence of berberine concentrations of 1.9 µg/ml. However, berberine at concentrations of >1.9 µg/ml combined with an fluconazole supra-MIC (i.e., >1.9 µg/ml) eliminated the residual turbidity (grey area) in the incubation wells. This observation made it possible to use a different endpoint, the MIC-0. (B) Corresponding isobologram of *in vitro* interaction between berberine and fluconazole against *Candida albicans*. The dotted line indicates the theoretical additive activity.

Fig. 3 Scanning electron microscopy photographs of *Candida albicans* ATCC 10231 treated with berberine alone and in combination with fluconazole. (a) Control; (b) berberine 10 µg/ml; (c) fluconazole 6 µg/ml; and (d) berberine plus fluconazole. Bar = 10 µm.

Quebra de coluna

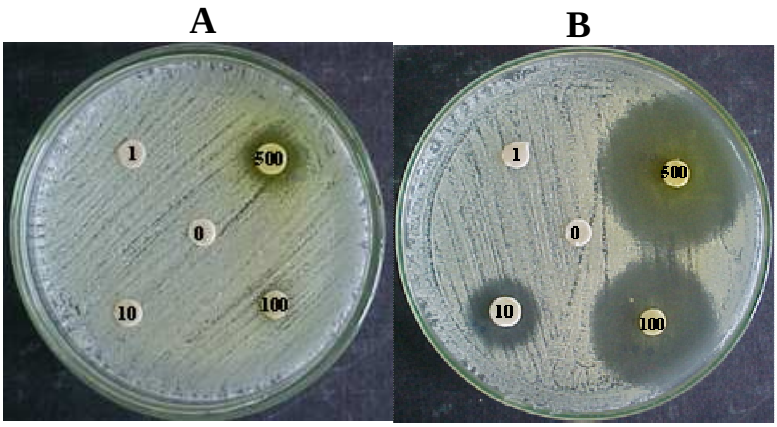
Table 1. Agar disk testing: antifungal indices of Berberine tested alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*.

Candida albicans strains	Antifungal index (mm/µg)	
	Berberine alone	Berberine plus FLC
ATCC	0	1,0
21	0,0	1,3
52	0,1	2,1
55	0,1	2,0
56	0,1	2,5
62	0,0	1,3

111	0,2	1,7
174	0,0	2,0
197	0,0	0,8
250	0	2,0
299	0	0,8
306	0,2	1,0
367	0,0	1,3
372	0	0
385	0	1,0
393	0,0	1,2
396	0,0	1,3
405	0,1	1,9
410	0	1,2
427	0,1	0,7
443	0,1	0
454	0	0
465	0	1,5
504	0	1,5
505	0,0	1,5
Median	0,04	1,26
Range	0-0.2	0-2.1

Quebra de coluna

Fig. 1

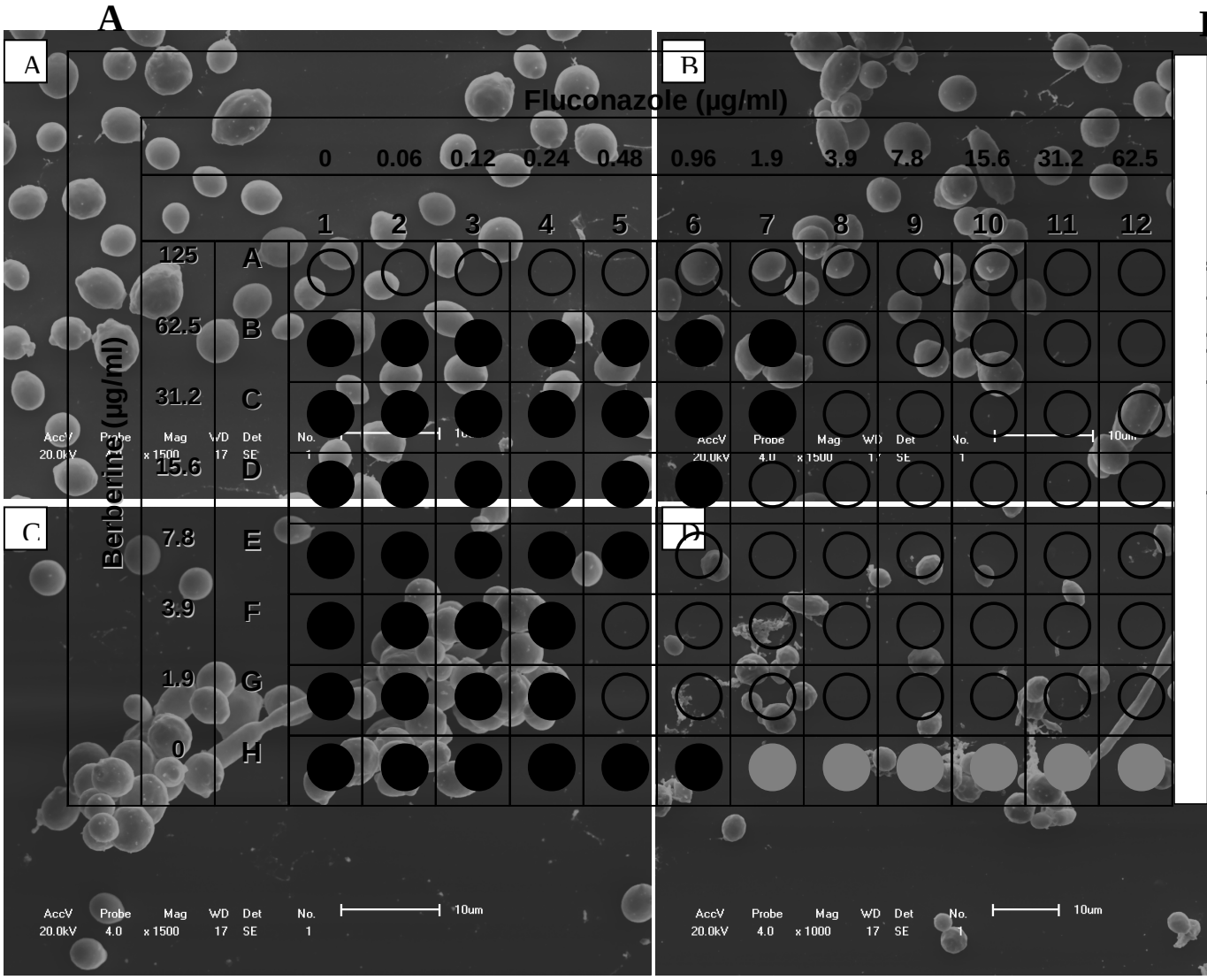


Quebra de seção (próxima página)

Fig . 2

Quebra de página

Fig 3



Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo