

CAMILA MIRANDA MOURA

**Contribuição à quimiotaxonomia de Anacardiaceae -
estudo fitoquímico e das atividades antifúngicas e antitumorais de
Astronium fraxinifolium Schott ocorrente no Cerrado**

Brasília, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CAMILA MIRANDA MOURA

**Contribuição à quimiotaxonomia de Anacardiaceae -
estudo fitoquímico e das atividades antifúngicas e antitumorais de
Astronium fraxinifolium Schott ocorrente no Cerrado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola

Brasília, 2014

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus por vosso auxílio e vossa proteção em todos os dias.

Agradeço ao nosso querido Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB que nos ajudou a coletar e identificar tantas plantas sempre com muito zelo e carisma. Obrigada professor por nos mostrar a beleza do Cerrado.

À Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola pelos ensinamentos desde a graduação.

À Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva/UFG por ter fornecido os isolados clínicos de fungos para os testes de avaliação antifúngica.

Aos pesquisadores Raphaël Grougnet e Marina Kritsanida do Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris-Descartes/França pelos ensinamentos nos fracionamentos cromatográficos e pela ajuda na elucidação das estruturas moleculares.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e aos especialistas Jacqueline Nakau Mendonça e José Carlos Tomaz do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos/USP de Ribeirão Preto pela fundamental contribuição nos estudos fitoquímicos.

À Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo/UFC pela ajuda na realização dos testes de citotoxicidade.

A toda equipe do Laboratório de Farmacognosia da UnB: professoras, pós-graduandos, estagiários e colaboradores.

Aos meus amigos Phellipe e Polyana pelos bons momentos que passamos juntos na lida do laboratório.

A Daniel e família pelo apoio e carinho.

Aos meus queridos pais pelo amor, carinho e paciência. Sem vocês não conseguiria finalizar este Mestrado. Muito obrigada!

RESUMO

As infecções fúngicas são agravos persistentes à saúde pública. O atual quadro das micoses revela o aumento de sua incidência mundial e o surgimento de espécies com resistência intrínseca a antifúngicos disponíveis. Diante disso, a comunidade científica tem se empenhado na busca de alternativas terapêuticas. Os produtos naturais têm sido intensamente investigados quanto à atividade biológica. No Brasil, o bioma Cerrado se destaca pela rica diversidade química, sendo fonte promissora para o isolamento de metabólitos secundários ativos. Assim, este trabalho avaliou a atividade de extratos e substâncias da espécie do Cerrado, *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae), em leveduras, dermatófitos e células tumorais. Em uma triagem de atividade de extratos dos órgãos de *A. fraxinifolium* em diferentes polaridades, o extrato acetato de etila da casca da raiz foi o mais ativo, apresentando amplo espectro de ação em todos os fungos testados com valores de CIM de 0,24 a 125 µg/mL. A partir desse extrato foram isolados dois triterpenos do tipo cicloartano: 3-β-cicloartenol (**1**) e 3-β-cicloeucaleinol (**2**). Com interesse em contribuir para a quimiotaxonomia de Anacardiaceae, o extrato acetato de etila das folhas também foi submetido ao fracionamento cromatográfico devido ao seu perfil químico e ao interesse na fitoquímica da espécie. Desse extrato foram identificados uma cetona esteroidal – tremulona (**3**) – e dois triterpenos pentacíclicos – β-amirina (**4**) e lupeol (**5**). Os compostos **1** e **2** apresentaram efeito citotóxico em células leucêmicas da linhagem HL-60 com valores de CI₅₀ de 10,8 µg/mL e 9,2 µg/mL, respectivamente.

Palavras-chave: Cerrado. Quimiotaxonomia de Anacardiaceae. *Astronium fraxinifolium*. Cicloartanos. Atividade antifúngica. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

Fungal infections are persistent public health issues. The current picture of mycoses reveals an increase in their global incidence and an arise of species with intrinsic resistance to available antifungal agents. Seeing that, the scientific community has been searching for therapeutic alternatives. The natural products have been thoroughly investigated for their biological activity. In Brazil, the Cerrado biome stands out for its rich chemical diversity, being a promising source for the isolation of active secondary metabolites. Therefore, the present work evaluated the activity of extracts and substances from the Cerrado's species, *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae), in yeasts, dermatophytes and tumoral cells. In a triage of activity from *A. fraxinifolium* organs' extracts in different polarities, the ethyl acetate extract from the root's bark was the most active, presenting broad-spectrum action in all the fungi tested with MIC values from 0.24 to 125 µg/ml. From this extract two cycloartane-type triterpenes were isolated: 3-β-cycloartenol (**1**) and 3-β-cycloeucalenol (**2**). In order to contribute to the chemotaxonomy of Anacardiaceae, the ethyl acetate extract from the leaves was also submitted to chromatographic fractionation due to its chemical profile and to the interest in the species' phytochemistry. From this extract were identified a steroidal ketone – tremulone (**3**) – and two pentacyclic triterpenes – β-amyrin (**4**) and lupeol (**5**). The compounds **1** and **2** showed cytotoxic effect on leukemic cells line HL-60 with IC₅₀ values of 10.8 µg/ml and 9.2 µg/ml, respectively.

Keywords: Cerrado. Chemotaxonomy of Anacardiaceae. *Astronium fraxinifolium*. Cycloartanes. Antifungal activity. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas moleculares dos taninos penta (1), hexa (2) e heptagalossilglucose (3)18
Figura 2	Estruturas moleculares das urundeuvinas A (1), B (2) e C (3).....19
Figura 3	Estrutura molecular do schinol.....20
Figura 4	Estruturas moleculares de geranina e galoilgeranina.....21
Figura 5	Estrutura molecular do ácido tânico21
Figura 6	(a) <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott. (b) Detalhe da casca do caule. (c) Detalhe das folhas. (d) Detalhe das inflorescências24
Figura 7	Distribuição geográfica de <i>Astronium fraxinifolium</i> no Brasil25
Figura 8	Estruturas moleculares de (a) (Z)- β -ocimeno e (E)- β -ocimeno. (b) bicilogermacreno. (c) limoneno. (d) α -terpinoleno. (e) viridifloreno27
Figura 9	Micrografia eletrônica da parede celular de <i>Candida albicans</i> com destaque para as camadas constituintes da parede.....29
Figura 10	Hifas de um fungo filamentososo com destaque para os esporos.30
Figura 11	Micélio de <i>Microsporium gypseum</i>30
Figura 12	Colônia de <i>Trichophyton rubrum</i> com destaque para o reverso com pigmentação vermelha.....31
Figura 13	Cultura de <i>Candida albicans</i> com detalhe para a estrutura esférica da levedura.....31
Figura 14	Esquema geral dos principais fármacos (anfotericina B, nistatina, griseofulvina e flucitosina) e classes (equinocandinas e azólicos) utilizados na terapia antifúngica e seus mecanismos de ação..36
Figura 15	Estrutura molecular da anfotericina B.....37
Figura 16	Estrutura molecular da nistatina.....38
Figura 17	Estrutura molecular da caspofungina, uma equinocandina.....39
Figura 18	Estrutura molecular da griseofulvina.....40

Figura 19	Estruturas moleculares do fluconazol e itraconazol.....	41
Figura 20	Estrutura molecular da terbinafina.....	42
Figura 21	Estrutura molecular da flucitosina.....	43
Figura 22	Fotos das fitofisionomias: (a) Cerradão. (b) Cerrado Sentido Restrito. (c) Campo Sujo.....	47
Figura 23	Distribuição geográfica da vegetação suprimida pela ação antrópica até 2010 e da vegetação remanescente.....	48
Figura 24	(a) Dessecação e estabilização dos órgãos vegetais. (b) Moinho de facas utilizado para pulverização dos órgãos vegetais.....	50
Figura 25	(a) Processo de extração por maceração. (b) Obtenção da solução extrativa por filtração. (c) Concentração da solução extrativa em evaporador rotatório. (d) Depósito dos extratos a -20 °C.....	51
Figura 26	Esquema da técnica de microdiluição.....	55
Figura 27	Adição das amostras e dos controles positivos à placa de microdiluição.....	56
Figura 28	Diluição seriada das amostras e dos controles positivos na placa de microdiluição.....	56
Figura 29	Resultados obtidos com 52 testes em duplicata realizados para os 13 extratos em 4 leveduras – 26 testes apresentaram CIM entre 0,24 e 125 µg/mL.....	65
Figura 30	Resultados obtidos com 52 testes em duplicata realizados para os 13 extratos em 4 dermatófitos – 16 testes apresentaram CIM entre 15,62 e 125 µg/mL.....	65
Figura 31	Placa de CCD com seta indicando o ponto de aplicação do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i> com pigmentação vermelha após revelação com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento. (1): fração hexânica (2): fração diclorometânica; (3): fração acetato de etila; (4): fração etanólica; (5): fração metanólica.....	68
Figura 32	Fluxograma de purificação do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i>	70

Figura 33	Placa de CCD com as frações obtidas em coluna de Sephadex LH 20. As setas indicam o ponto de aplicação de F4 a F7 com pigmentação vermelha após revelação com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.....	69
Figura 34	Esquema da partição água/diclorometano das frações F4 a F7 reunidas, provenientes do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i> em coluna de Sephadex LH 20.....	71
Figura 35	Fracionamento em coluna aberta de sílica da amostra de 3,15 g, proveniente do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i>	72
Figura 36	Placa de CCD com o perfil dos grupos G13 a G20 obtidos do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i>	74
Figura 37	Fluxograma de purificação do extrato acetato de etila das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i>	76
Figura 38	Placa de CCD com as frações F34 a F39 obtidas do fracionamento da reunião de G10 e G11 do extrato acetato de etila das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i> . A fração F38 corresponde ao grupo G6 (44,4 mg) de onde foram identificados β -amirina (4) e lupeol (5).....	78
Figura 39	Esquema da síntese de cicloartenol e cicloeucalenol.....	79
Figura 40	Estrutura molecular do 3- β -cicloartenol isolado do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i>	80
Figura 41	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G13.....	81
Figura 42	Detalhe da expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G13.....	81
Figura 43	Espectro HSQC do grupo G14.....	82
Figura 44	Expansão do espectro HSQC do grupo G14.....	82
Figura 45	Espectro HMBC do grupo G14.....	83
Figura 46	Espectro COSY do grupo G14.....	83
Figura 47	Expansão do espectro COSY do grupo G14.....	84
Figura 48	Espectro de massa do grupo G14 em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$	84

Figura 49	Estrutura molecular do 3- β -cicloeucaleanol.....	86
Figura 50	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G23.....	87
Figura 51	Detalhe da expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G23.....	87
Figura 52	Espectro HSQC do grupo G17.....	88
Figura 53	Expansão do espectro HSQC do grupo G17.....	88
Figura 54	Espectro HMBC do grupo G17.....	89
Figura 55	Expansão do espectro HMBC do grupo G17.....	89
Figura 56	Espectro COSY do grupo G23.....	90
Figura 57	Espectro de massa do grupo G17 em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$	90
Figura 58	Estrutura molecular da tremulona.....	92
Figura 59	Espectro de massas da tremulona obtido por impacto eletrônico (70 eV).....	92
Figura 60	Estrutura molecular da β -amirina.....	93
Figura 61	Estrutura molecular do lupeol.....	93
Figura 62	Espectro de massas da β -amirina obtido por impacto eletrônico (70 eV).....	94
Figura 63	Espectro de massas da β -amirina obtido por impacto eletrônico (70 eV).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividades biológicas de espécies da família Anacardiaceae descritas na literatura.....	17
Tabela 2	Cepas e isolados clínicos utilizados na avaliação da atividade antifúngica.....	52
Tabela 3	Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) dos extratos brutos de <i>Astronium fraxinifolium</i> em leveduras e dermatófitos.....	63
Tabela 4	Fracionamento em coluna aberta de sílica da amostra de 3,15 g, proveniente do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Astronium fraxinifolium</i>	72
Tabela 5	Fracionamento em coluna aberta de sílica do extrato acetato de etila das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i>	75
Tabela 6	Fracionamento em coluna aberta de sílica da reunião de G10 e G11, provenientes do extrato acetato de etila das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i>	77
Tabela 7	Fracionamento em coluna aberta de sílica do grupo G5, proveniente da reunião de G10 e G11 do extrato acetato de etila das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i>	77
Tabela 8	Valores de CI ₅₀ (µg/mL) dos grupos G13 e G14 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL.....	85
Tabela 9	Valores de CI ₅₀ (µg/mL) dos grupos G17 e G18 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL.....	91
Tabela 10	Valores de CI ₅₀ (µg/mL) dos grupos G6 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL.....	95
Tabela 11	Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) dos grupos G39, G45, G48 e G52 em leveduras.....	96

Tabela 12	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos grupos G39, G45, G48 e G52 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de $25 \mu\text{g/mL}$	97
------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCI₃	Clorofórmio deuterado
CGEN/MMA	Comissão de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente
CG	Cromatografia Gasosa
CI₅₀	Concentração Inibitória 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMSP	Células mononucleadas de sangue periférico humano
COSY	Espectroscopia de correlação (<i>correlated spectroscopy</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massa
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum coherence</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LMGO	Laboratório de Micologia de Goiás
LPS	Lipopolissacarídeo
CFM	Concentração Fungicida Mínima
MOPS	Ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
m/z	Relação massa/carga
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A FAMÍLIA ANACARDIACEAE.....	15
1.2 A ESPÉCIE <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott.....	23
1.3 ASPECTOS GERAIS DOS FUNGOS.....	28
1.4 AS INFECÇÕES FÚNGICAS.....	32
1.4.1 As infecções causadas por leveduras do gênero <i>Candida</i>	33
1.4.2 As infecções causadas por dermatófitos	34
1.5 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS.....	35
1.5.1 Agentes antifúngicos derivados de produtos naturais	36
1.5.1.1 Anfotericina B.....	36
1.5.1.2 Nistatina.....	38
1.5.1.3 Equinocandinas.....	38
1.5.1.4 Griseofulvina.....	39
1.5.2 Agentes antifúngicos sintéticos	40
1.5.2.1 Derivados azólicos.....	40
1.5.2.2 Terbinafina.....	42
1.5.2.3 Flucitosina.....	42
1.6 BUSCA DE NOVOS ANTIFÚNGICOS DE ORIGEM VEGETAL.....	43
1.7 BUSCA DE NOVOS ANTITUMORAIS DE ORIGEM VEGETAL.....	44
1.8 O BIOMA CERRADO.....	46
2 OBJETIVOS	49
2.1 OBJETIVO GERAL.....	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL.....	50
3.2 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	50
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	51
3.3.1 Obtenção e manutenção dos fungos	51

3.3.2 Teste de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	52
3.3.3 Preparo do meio de cultura RPMI 1640	52
3.3.4 Preparo das amostras	53
3.3.5 Preparo dos controles positivos	53
3.3.6 Preparo do inóculo de leveduras	53
3.3.7 Preparo do inóculo de fungos filamentosos	54
3.3.8 Técnica de microdiluição	54
3.3.9 Leitura dos resultados para determinação da CIM	57
3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>	57
3.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	58
3.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	58
3.5.2 Cromatografia em Coluna Sephadex LH 20	59
3.5.3 Cromatografia em Coluna Aberta de Sílica	59
3.5.3.1 Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>A. fraxinifolium</i>	59
3.5.3.2 Fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de <i>A. fraxinifolium</i>	59
3.5.4 Cromatografia Gasosa (CG)	60
3.6 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS	60
3.6.1 Espectrometria de Massas	60
3.6.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO DE <i>A. fraxinifolium</i>	62
4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAIZ DE <i>A. fraxinifolium</i>	68
4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>A. fraxinifolium</i>	74
4.4 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA CASCA DA RAIZ E DAS FOLHAS DE <i>A. fraxinifolium</i>	78
4.4.1 Triterpenos do tipo cicloartano	78
4.4.1.1 Composto 3- β -cicloartenol.....	80

4.4.1.2 Composto 3- β -cicloeucaleanol.....	86
4.4.2 Tremulona.....	92
4.4.3 β-amirina e lupeol.....	93
4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL DE OUTROS GRUPOS OBTIDOS DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAIZ DE <i>A. fraxinifolium</i>	96
5. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae é constituída por cerca de 76 gêneros e 600 espécies de distribuição geográfica predominantemente pantropical (CORREIA *et al.*, 2006). Muitas de suas espécies têm importância biológica e econômica, sendo empregadas em diversas áreas, tais como: alimentação, paisagismo, extração de tanino e verniz, produção de substâncias para uso na indústria e na medicina e aproveitamento de madeira para construção (SANTIN, 1989; BARROSO, 1991). Os frutos e pseudofrutos das espécies de Anacardiaceae são fontes importantes de alimento, como, por exemplo, o caju – *Anacardium occidentale*, a manga – *Mangifera indica*, e o pistache – *Pistacia vera* (MONTANARI *et al.*, 2012).

Por outro lado, cerca de 25% dos gêneros são tóxicos e causadores de dermatites de contato severas devido à produção de substâncias alergênicas, com destaque para o gênero *Rhus* (AGUILAR-ORTIGOZA & SOSA, 2004; CORREIA *et al.*, 2006). Tais substâncias são fenóis dos tipos alquilcatecóis, alquilresorcinóis e biflavonóides (AGUILAR-ORTIGOZA & SOSA, 2004). Elas são encontradas em canais resinosos e têm, dentre outras funções, proteger as plantas do crescimento de fungos fitopatogênicos e insetos (AGUILAR-ORTIGOZA *et al.*, 2003; AGUILAR-ORTIGOZA & SOSA, 2004). O cardol, por exemplo, é um composto fenólico alergênico encontrado no caju (AGUILAR-ORTIGOZA & SOSA, 2004). No gênero *Astronium*, são encontrados alquilcatecóis e biflavonóides, estando presentes usualmente nas folhas e cascas (AGUILAR-ORTIGOZA & SOSA, 2004).

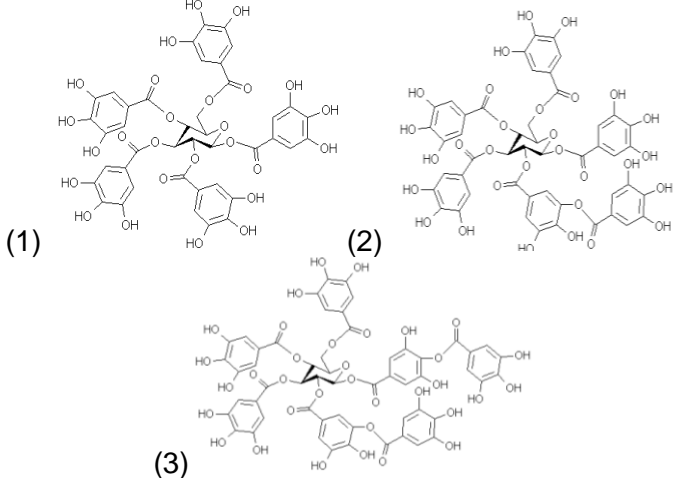
Os estudos de isolamento e identificação de metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae ainda são incipientes. Estima-se que menos de 7% das espécies conhecidas foram investigadas quanto à fitoquímica e atividade biológica. Os gêneros mais pesquisados são *Anacardium*, *Lannea*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Pistacia*, *Rhus*, *Schinus*, *Semecarpus*, *Spondias* e *Tapirira*. Dentre esses gêneros, *Anacardium*, *Mangifera* e *Rhus* possuem o maior número de estudos sobre a composição química e a atividade biológica de seus extratos e substâncias isoladas. As classes de metabólitos secundários típicas da família são os lipídios fenólicos, que compreendem substâncias fenólicas e catecólicas, e os flavonóides, principalmente os biflavonóides. Esses metabólitos são encontrados em espécies

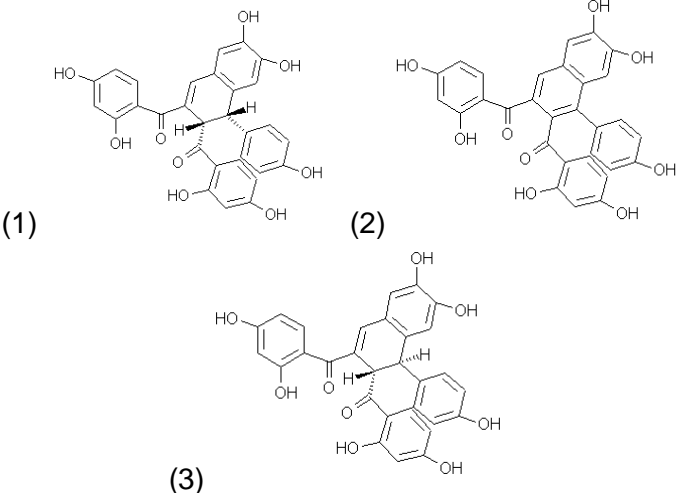
que normalmente possuem propriedades tóxicas ou alergênicas. Terpenos, esteróides e xantonas também podem ser encontrados em espécies da família (CORREIA *et al.*, 2006).

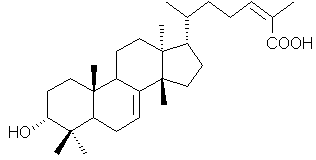
Na literatura, encontram-se diversos estudos que descrevem a atividade antimicrobiana, especialmente antibacteriana e antifúngica, de espécies de Anacardiaceae. Há também descrição de atividades antioxidante, inibidora da ação da acetilcolinesterase, antiulcerogênica, anti-inflamatória, analgésica, citotóxica, antiparasitária e antiviral. Alguns desses estudos estão descritos na Tabela 1.

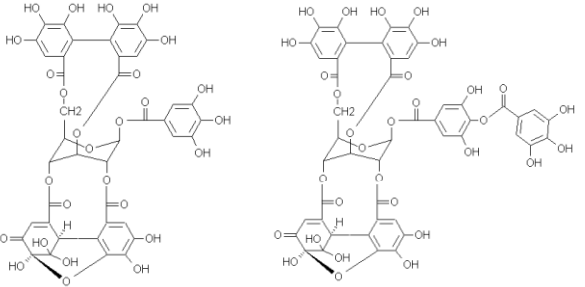
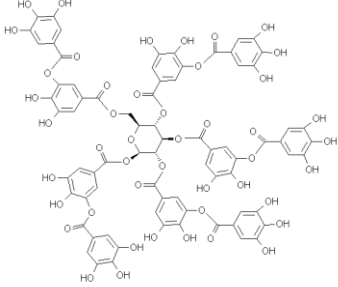
Tabela 1 – Atividades biológicas de espécies da família Anacardiaceae descritas na literatura.

Espécie	Nome popular	Usos na medicina tradicional	Atividades biológicas descritas na literatura
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Cajueiro	A casca do caule é utilizada para inflamação da garganta, úlceras e diarreia (LORENZI & MATOS, 2002).	O extrato hidroetanólico das folhas, rico em compostos fenólicos como flavonóides e taninos condensados, foi efetivo na prevenção de úlceras induzidas em camundongos (KONAN & BACCHI, 2007).
<i>Cotinus coggygria</i> Scop.	Árvore do fumo	Arbusto encontrado no sul e sudeste europeu, sendo conhecido por suas propriedades antissépticas, anti-inflamatórias e anti-hemorrágicas (MARČETIĆ <i>et al.</i> , 2013).	O extrato acetônico dos brotos das folhas e dos ramos exibiu atividade em <i>Staphylococcus aureus</i> (CIM 25 µg/mL), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (CIM 25 µg/mL) e <i>Candida albicans</i> (CIM 6,2 µg/mL). A fração acetato de etila, que continha a maior concentração de taninos e flavonoides, exibiu CIM de 25 µg/mL em <i>Bacillus subtilis</i> e de 50 µg/mL em <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> . O extrato e a fração apresentaram atividade antioxidante com inibição de lipoperoxidação superior ao do controle ácido gálico. A referida fração também exibiu ação anti-inflamatória <i>in vivo</i> e efeito citotóxico em células HeLa (MARČETIĆ <i>et al.</i> , 2013).
<i>Lannea barteri</i> (Oliv.) Engl.	-	Planta medicinal utilizada em países da África ocidental no tratamento de feridas, reumatismos, diarreia e escorbuto (KONÉ <i>et al.</i> , 2011).	Os extratos metanólicos da casca do caule e da raiz exibiram atividade em cepas sensíveis e resistentes de <i>S. aureus</i> – incluída MRSA (<i>S. aureus</i> resistente à meticilina) –, <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Proteus mirabilis</i> , com CIM variando de 47 a 375 µg/mL. Os extratos diclorometânicos inibiram o crescimento de <i>C. albicans</i> e exibiram atividade inibidora da acetilcolinesterase (KONÉ <i>et al.</i> , 2011).

Espécie	Nome popular	Usos na medicina tradicional	Atividades biológicas descritas na literatura
<i>Lithrea molleoides</i> (Vell.) Engl.	Aroeira-brava ou Aroeira branca	Espécie encontrada em diversos países da América do Sul (MUSCHIETTI <i>et al.</i> , 2005). A tintura e a decocção são utilizadas para tosse e bronquite (KOTT <i>et al.</i> , 1999). A decocção dos galhos é empregada no tratamento de doenças respiratórias e digestivas (MUSCHIETTI <i>et al.</i> , 2005).	O extrato metanólico das partes aéreas foi ativo em isolados clínicos de <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Epidermophyton floccosum</i> , e em cepa ATCC de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> com CIM de 250 µg/mL (MUSCHIETTI <i>et al.</i> , 2005). O extrato aquoso das folhas exibiu atividade antiviral <i>in vitro</i> em HSV-1 (vírus herpes simplex tipo 1) com DE ₅₀ de 51,5 µg/mL e RSV (vírus sincicial respiratório) com DE ₅₀ de 78 µg/mL (KOTT <i>et al.</i> , 1999).
<i>Mangifera indica</i> L.	Mangueira	A casca é utilizada para dores estomacais; o fruto, no tratamento de diarreia (SINGH <i>et al.</i> , 2010).	<p>Os galotaninos isolados das sementes – penta, hexa e heptagaloioglucose (Figura 1) – exibiram atividade em <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>B. subtilis</i> e <i>S. aureus</i> (ENGELS <i>et al.</i>, 2009).</p>  <p>(1) (2) (3)</p> <p>Figura 1 – Estruturas moleculares dos taninos penta (1), hexa (2) e heptagaloioglucose (3) (ENGELS <i>et al.</i>,</p>

			<p>2009). O extrato hidroalcolico da casca do caule exibiu atividade em <i>C. albicans</i> (CIM 0,08 mg/mL) (SINGH <i>et al.</i>, 2010).</p>
<p><i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão</p>	<p>Aroeira do sertão</p>	<p>Espécie comum na caatinga nordestina. O extrato aquoso da casca do caule é usado como anti-inflamatório do trato genital feminino ou, na forma de infusão ou decocção, no tratamento de doenças dos tratos respiratório e urinário, metrorragias e diarreias (VIANA <i>et al.</i>, 2003).</p>	<p>Três chalconas diméricas (urundeuvinas A, B e C) (Figura 2) isoladas do extrato acetato de etila da casca do caule exibiram atividades analgésica e anti-inflamatória em testes realizados em camundongos (VIANA <i>et al.</i>, 2003).</p> <div style="text-align: center;">  <p>(1) (2) (3)</p> </div> <p>Figura 2 – Estruturas moleculares das urundeuvinas A (1), B (2) e C (3) (VIANA <i>et al.</i>, 2003).</p> <p>O óleo essencial das folhas exibiu atividade em <i>Bacillus cereus</i> (0,63 g/L), <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> (0,31 g/L) (MONTANARI <i>et al.</i>, 2012). O extrato etanólico das folhas apresentou forte atividade <i>in vitro</i> com inibição da replicação do rotavírus SA11 (CECÍLIO <i>et al.</i>, 2012).</p>

Espécie	Nome popular	Usos na medicina tradicional	Atividades biológicas descritas na literatura
<i>Pistacia vera</i> L.	Pistache	Planta nativa da Ásia (ÖZÇELIK <i>et al.</i> , 2005). As espécies do gênero <i>Pistacia</i> são utilizadas no tratamento de eczema, diarreia, infecções de garganta e asma (DURU <i>et al.</i> , 2003).	Extratos hexânicos das folhas, do caule e das sementes exibiram atividade em <i>C. albicans</i> ATCC 10231 e <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 com CIM de 16 µg/mL (ÖZÇELIK <i>et al.</i> , 2005).
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Aroeira da praia ou Aroeira vermelha	Espécie utilizada em casos de distúrbios urinários, bronquite e outros problemas do sistema respiratório superior, distúrbios de hemorragias e inflamação (LORENZI & MATOS, 2002).	<p>Extrato metanólico das folhas ativo em <i>Leishmania amazonensis</i> (CI₅₀ 55 µg/mL) e em cepa ATCC de <i>C. albicans</i> (CIM 1,25 mg/mL) (BRAGA <i>et al.</i>, 2007). A fração hexânica do extrato hidroalcolico das folhas (CIM ≤ 125 µg/mL) e o extrato hidroalcolico do caule (CIM 30 µg/mL) exibiram atividade em isolados clínicos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>. Schinol (Figura 3), isolado da fração hexânica, exibiu atividade nos isolados clínicos com CIM ≤ 250 µg/mL (JOHANN <i>et al.</i>, 2010).</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Figura 3 – Estrutura molecular do schinol (JOHANN <i>et al.</i>, 2010).</p>
<i>Semecarpus anacardium</i> L.f.	Anacárdio oriental	Espécie nativa da Índia. O fruto é utilizado em doenças de pele como psoríase. A noz é utilizada no tratamento de sífilis, doenças de pele, asma, dispepsia e hemorróidas (SINGH <i>et al.</i> , 2010).	O extrato metanólico da casca do caule inibiu o crescimento de <i>C. albicans</i> resistente à clotrimazol (SHAHIDI BONJAR, 2004). O extrato etanólico da semente inibiu o crescimento e a reprodução de <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>C. albicans</i> (SHARMA <i>et al.</i> , 2002).

Espécie	Nome popular	Usos na medicina tradicional	Atividades biológicas descritas na literatura
<i>Spondias mombin</i> L.	Cajazeiro	Encontrada na Nigéria, Brasil e em outros locais com florestas tropicais. A decocção da casca é utilizada como emético e em casos de diarreia, disenteria, hemorróidas, gonorreia e leucorreia (AYOKA <i>et al.</i> , 2008).	<p>Dois elagitaninos, geranina e galoilgeranina (Figura 4), isolados das folhas e do caule exibiram atividade antiviral relevante em <i>Coxsackie</i> e <i>Herpes simplex</i> (CORTHOUT <i>et al.</i>, 1991).</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Figura 4 – Estruturas moleculares de geranina e galoilgeranina (CORTHOUT <i>et al.</i>, 1991).</p> <p>Ácido tânico (Figura 5) isolado do extrato etanólico das folhas apresentou CI_{50} de 11,26 $\mu\text{g/mL}$ em promastigotas e 0,27 $\mu\text{g/mL}$ em amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> (ACCIOLY <i>et al.</i>, 2012).</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Figura 5 – Estrutura molecular do ácido tânico (ACCIOLY <i>et al.</i>, 2012).</p>

Espécie	Nome popular	Usos na medicina tradicional	Atividades biológicas descritas na literatura
<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	Pau-pombo	Espécie muito utilizada na medicina tradicional da Guiana Francesa. A decocção da casca é empregada contra malária e diarreia. A seiva é aplicada em casos de sapinho, feridas com infecção bacteriana ou fúngica e em leishmaniose cutânea (ROUMY <i>et al.</i> , 2009).	Extrato diclorometânico da casca exibiu atividade em <i>Plasmodium falciparum</i> (CI ₅₀ 18 µg/mL). Desse extrato, isolou-se uma mistura de derivados alquilpolióis cíclicos ativos em <i>L. amazonensis</i> (CI ₅₀ 1 µM), <i>P. falciparum</i> sensível à cloroquina (CI ₅₀ 4,7 µM) e resistente à cloroquina (CI ₅₀ 5,4 µM), <i>S. aureus</i> (CI ₅₀ 75,4 µM) e <i>S. epidermidis</i> (CI ₅₀ 17,6 µM) (ROUMY <i>et al.</i> , 2009).

1.2 A ESPÉCIE *Astronium fraxinifolium* Schott

Dentre as diversas espécies da família Anacardiaceae, tem-se a espécie arbórea do Cerrado *Astronium fraxinifolium* Schott (Figura 6), conhecida na medicina tradicional por diversos nomes: Gonçalo-Alves, Pau-Gonçalves, gonçaleiro, chibata e aroeira-do-campo (CORRÊA, 1978; LORENZI, 1992). É considerada uma planta heliófita, típica de terrenos rochosos e secos, onde forma agrupamentos isolados (LORENZI, 1992).

O gênero *Astronium* foi descrito pela primeira vez por Jacquin em 1760 e compreende oito espécies distribuídas desde o México até a Argentina (SANTIN, 1989; LEITE, 2002). Dessas oito espécies, sete ocorrem no Brasil, podendo ser encontradas em diversos *habitats*, além do Cerrado, como Caatinga, Floresta Amazônica e Mata Atlântica (SANTIN, 1989). O nome do gênero deriva do grego *astron*, que significa estrela, referindo-se ao formato do cálice da flor com cinco sépalas (SANTIN, 1989). Em 1827 a espécie *A. fraxinifolium* foi descrita por Schott (LEITE, 2002).



Figura 6 – (a) *Astronium fraxinifolium* Schott. (b) Detalhe da casca do caule. (c) Detalhe das folhas. (d) Detalhe das inflorescências. Fonte: Arquivo do Laboratório de Farmacognosia/UnB

(CORRÊA, 1978). A floração ocorre nos meses de julho e agosto, e a frutificação, nos meses de setembro e outubro (RIZZINI, 1971).

Várias partes de *A. fraxinifolium* são tradicionalmente utilizadas como medicinais devido principalmente à presença de taninos (ALMEIDA *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 2002). Sua casca, tanífera e resinífera, é adstringente, sendo utilizada em casos de bronquite, tuberculose pulmonar, diarreias e hemorróidas (BRAGA, 1976; CORRÊA, 1978; LORENZI, 1992). As folhas possuem ação antisséptica e são indicadas no tratamento de úlceras da pele por via tópica; e as raízes são usadas no tratamento do reumatismo (LORENZI, 1992; ALMEIDA *et al.*, 1998; SALOMÃO & SILVA, 2006). O óleo extraído da casca e dos frutos é cáustico e irritante, sendo empregado no tratamento de calos e dor de dentes (BRAGA, 1976).

A espécie possui grande importância econômica devido à sua madeira de excelente qualidade – pesada, compacta, rígida, de grande durabilidade em condições naturais e com grande conteúdo de tanino, o que confere resistência à decomposição e à imputrescibilidade (SANTIN, 1989; LORENZI, 1992). É utilizada em atividades de construção civil e naval, marcenaria e para confecção de dormentes e portas de fino acabamento (LORENZI, 1992; AGUIAR *et al.*, 2001). A casca é utilizada na indústria de couros para curtimento (LEITE, 2002). Trata-se de uma árvore melífera e ornamental, sendo empregada em paisagismo por seu porte médio e beleza da copa (LORENZI, 1992; AGUIAR *et al.*, 2001; SALOMÃO & SILVA, 2006).

Como possui excelente germinação e se desenvolve rapidamente no campo, *A. fraxinifolium* tem sido utilizado na recuperação de áreas degradadas pela ação antrópica (LORENZI, 1992; FELFILI *et al.*, 2000; CALDEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007). Dessa forma, a espécie contribui para a preservação da flora e da fauna, recomposição da paisagem e conservação dos recursos hídricos (CALDEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Em relação às substâncias identificadas de *A. fraxinifolium*, a literatura relata estudos químicos do óleo essencial das folhas, sendo majoritários os componentes (Z)- β -ocimeno, (E)- β -ocimeno, biciclogermacreno, limoneno, α -terpinoleno e viridifloreno (Figura 8) (MAIA *et al.*, 2002; MONTANARI *et al.*, 2012).

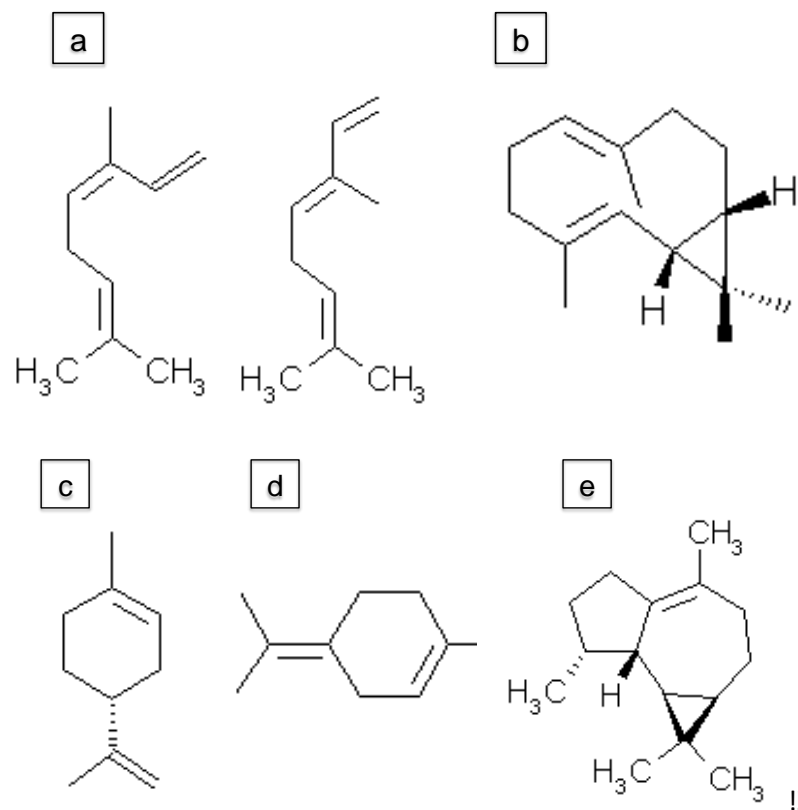


Figura 8 – Estruturas moleculares de (a) (Z)-β-ocimeno e (E)-β-ocimeno. (b) bicylogermacreno. (c) limoneno. (d) α-terpinoleno. (e) viridifloreno.

Quanto às atividades biológicas, há relato na literatura de atividade *in vitro* do óleo essencial das folhas em *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*, com valores de CIM variando de 0,31 a 1,25 mg/mL (MONTANARI *et al.*, 2012). O extrato metanólico das folhas exibiu atividade *in vitro* em *Colletotrichum lindemuthianum*, fungo fitopatogênico causador de antracnose em feijoeiros (PINTO *et al.*, 2010).

Há também descrição de ação antimicrobiana de outras espécies de *Astronium* spp. O extrato metanólico da casca de *A. balansae* apresentou atividade antibacteriana em cepas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *K. pneumoniae* e também em isolados clínicos de *S. aureus* e *Enterococcus faecium* (SALVAT *et al.*, 2004); o óleo essencial das folhas de *A. graveolens* exibiu atividade antibacteriana em cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. heidelberg*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com valores de CIM variando de 0,25 a 2 µg/mL (HERNÁNDEZ *et al.*, 2013). O extrato metanólico das folhas de *A. graveolens* apresentou atividade antioxidante significativa (CE₅₀ 37,65 µg/mL) e

atividade antiangiogênica – na concentração de 1 mg/mL reduziu mais de 50% a interação entre o fator de crescimento placentário e seu respectivo receptor. O galotanino 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-D-glucopiranosose (Figura 1, Tabela 1) isolado do extrato exibiu maiores atividades antioxidante (CE_{50} 2,16 μ g/mL) e antiangiogênica – na concentração de 50 μ M reduziu a interação citada em 58% (HERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Considerando os poucos estudos fitoquímicos e biológicos existentes de *A. fraxinifolium* e que menos de 7% das espécies de Anacardiaceae foram investigadas quanto à fitoquímica e farmacologia, essa espécie foi escolhida para pesquisa.

1.3 ASPECTOS GERAIS DOS FUNGOS

Os fungos são seres eucarióticos essencialmente do meio exterior, sendo encontrados na superfície dos solos, na água e nos vegetais (ZAITZ *et al.*, 2010). No que concerne a estrutura celular, a membrana plasmática possui um esteroide predominante, o ergosterol, que difere as células fúngicas das animais, que possuem colesterol (ZAITZ *et al.*, 2010). Externamente à membrana plasmática encontra-se uma parede celular rígida composta por elementos insolúveis em água – quitina, glucanas e mananas dispersas em polissacarídeos hidrossolúveis (Figura 9) (HARDISON & BROWN, 2012). Além de manter o arcabouço estrutural da célula, a parede é fundamental para a manutenção da homeostase, a comunicação celular e a digestão enzimática de substratos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

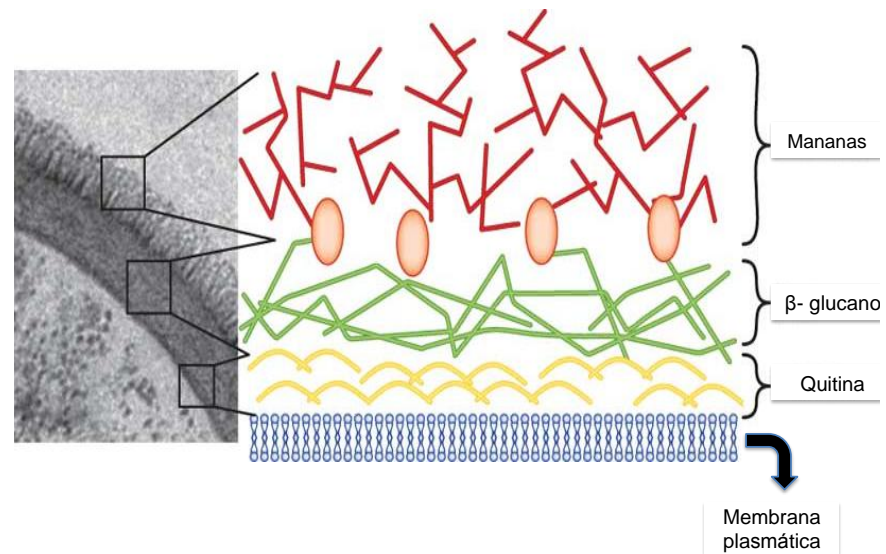


Figura 9 – Micrografia eletrônica da parede celular de *Candida albicans* com destaque para as camadas constituintes da parede. Fonte: HARDISON & BROWN, 2012 (traduzido).

Morfologicamente, os fungos são classificados em filamentosos ou leveduras, sendo que a maioria se apresenta na forma filamentosa na natureza (SIDRIM & ROCHA, 2004). Os fungos filamentosos são seres multicelulares e seu corpo é formado por longos filamentos de células interligadas denominados de hifas (Figura 10). A hifa vegetativa é responsável pela obtenção de nutrientes para a colônia, enquanto que a porção relacionada com a reprodução e disseminação da espécie por meio da produção de esporos é a hifa reprodutiva. Dependendo das condições ambientais, o crescimento das hifas pode levar à formação de uma massa filamentosa visível a olho nu, denominada de micélio (Figura 11) (TORTORA *et al.*, 2012).

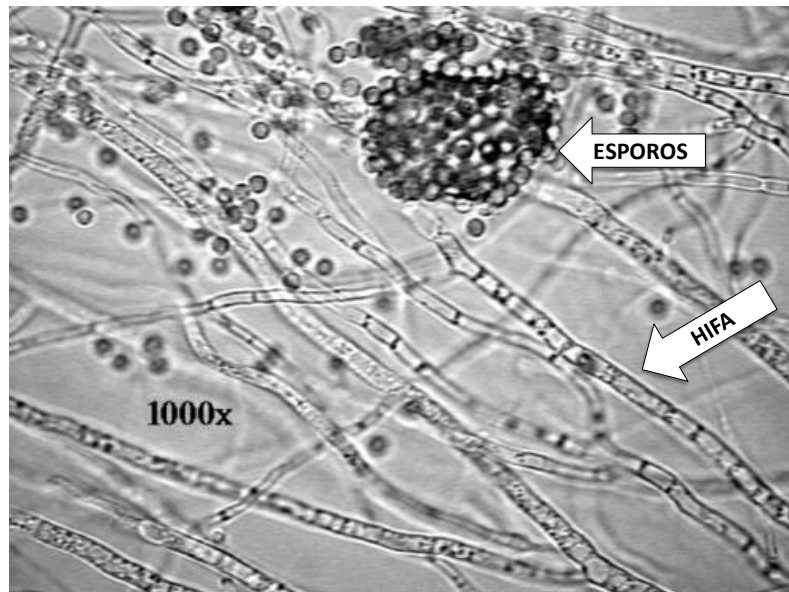


Figura 10 – Hifas de um fungo filamentosos com destaque para os esporos.

Fonte: www.mycology.adelaide.edu.au

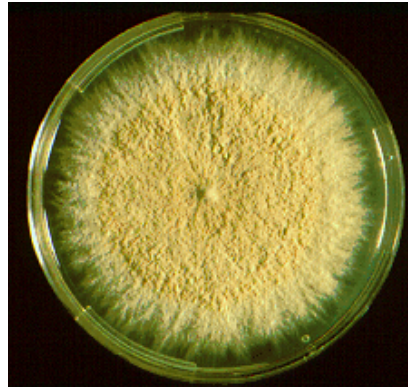


Figura 11 – Micélio de *Microsporium gypseum*.

Fonte: www.mycology.adelaide.edu.au

Os fungos filamentosos, quando em meio de cultura, formam colônias que podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas e com diversos tipos de pigmentação (ZAITZ *et al.*, 2010). As colônias da espécie *Trichophyton rubrum*, por exemplo, produzem uma pigmentação vermelha (Figura 12).



Figura 12 – Colônia de *Trichophyton rubrum* com destaque para o reverso com pigmentação vermelha.

As leveduras são seres unicelulares de formato esférico ou oval (Figura 13) (ZAITZ *et al.*, 2010). Em meio de cultivo, a maioria das leveduras forma colônias glabras, de coloração branca ou bege, com superfície lisa e textura cremosa ou pastosa (MILAN & ZAROR, 2004).

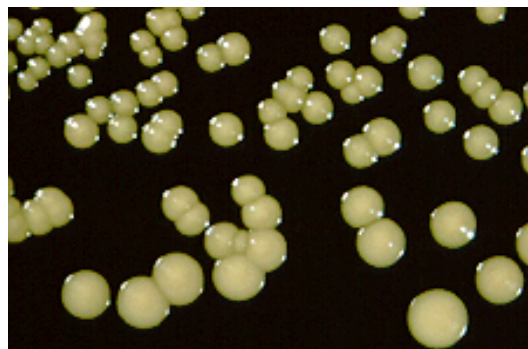


Figura 13 – Cultura de *Candida albicans* com detalhe para a estrutura esférica da levedura. Fonte: www.mycology.adelaide.edu.au

Alguns fungos, especialmente os patogênicos *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* são dimórficos, isto é, dependendo das condições ambientais, podem estar na forma filamentosa ou leveduriforme (SIDRIM & ROCHA, 2004). O dimorfismo é um importante fator de virulência envolvido no

mecanismo de patogênese das infecções fúngicas, pois permite a invasão do fungo nos tecidos e facilita o escape do micro-organismo das defesas do sistema imune do hospedeiro (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

1.4 AS INFECÇÕES FÚNGICAS

A maioria dos fungos são seres saprófitos que se alimentam de restos orgânicos do solo, ajudando na reciclagem da biomassa na natureza (ZAITZ *et al.*, 2010). Outros, como as leveduras do gênero *Candida*, são comensais que fazem parte da microbiota normal de homens e animais, sendo encontrados em diferentes percentuais na pele, cavidade oral, trato gastrointestinal, uretra e trato respiratório superior (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010). Entende-se por microbiota normal o grupo de micro-organismos que colonizam, em frequência variável, uma ou mais regiões anatômicas de um hospedeiro sadio sem produzir doenças (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Quando ocorre um desequilíbrio na relação harmônica fungo-hospedeiro, as leveduras da microbiota se tornam patogênicas, causando infecções oportunistas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010). Esse desequilíbrio pode ser desencadeado pelo rompimento de barreiras anatômicas, como em cirurgias invasivas, ventilação mecânica e queimaduras, ou pelo comprometimento de mecanismos de defesa do hospedeiro (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010). Neste último caso, os principais fatores de risco para as infecções fúngicas são neoplasias, disfunções metabólicas (como diabetes), imunodeficiências congênitas ou adquiridas, cirrose hepática, doença obstrutiva pulmonar crônica, desnutrição, corticoterapia, antibioticoterapia prolongada, transplantes de órgãos e medula óssea e idade avançada (FALCONE *et al.*, 2014). Desde o final da década de 1960, observa-se uma crescente incidência mundial das infecções fúngicas, influenciada pelo aumento do número de casos que envolvem esses fatores de risco (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Os fungos saprófitos do meio ambiente também podem causar doenças invasivas. Em geral, eles são transportados pelo ar e inalados pelo homem, iniciando uma infecção no trato respiratório que pode se disseminar para outras regiões do corpo. É o caso de *Aspergillus fumigatus* e *Pneumocystis carinii*, causadores de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. A

infecção por ingestão, apesar de rara, pode ocorrer quando são ingeridos suplementos alimentares produzidos a partir de substâncias naturais que não passaram por um adequado controle de qualidade para a remoção de esporos fúngicos (VAN BURIK & MAGEE, 2001).

1.4.1 As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*

As infecções causadas por *Candida* spp. são denominadas candidíases ou candidoses e são o tipo de infecção oportunista mais frequente na população, estando associada com níveis elevados de morbidade e mortalidade (ZAITZ *et al.*, 2010).

As candidíases são classificadas em mucocutâneas e sistêmicas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010). As mucocutâneas incluem as infecções de pele, unhas (onicomicoses), mucosas orofaríngeas (candidíase oral, conhecida popularmente como “sapinho”) e mucosas genitais (vulvovaginites) (ZAITZ *et al.*, 2010). As candidíases sistêmicas são as invasivas e podem atingir órgãos do Sistema Nervoso Central e dos tratos respiratório, gastrointestinal e urinário (ZAITZ *et al.*, 2010). A infecção da corrente sanguínea é denominada candidemia e é uma das mais prevalentes candidíases sistêmicas, sendo considerada grave problema de saúde pública mundial (PFALLER *et al.*, 2014).

Apesar do conhecimento dos fatores de risco para a infecção e dos avanços na terapia antifúngica, a taxa de mortalidade associada a candidíases invasivas ultrapassa 50% e sua incidência é crescente (ANDES *et al.*, 2012). Ademais, nas últimas décadas, diversos estudos longitudinais têm documentado a emergência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* e a resistência intrínseca que possuem a algumas classes de antifúngicos (PFALLER *et al.*, 2014). As espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, por exemplo, representam as duas espécies mais prevalentes com resistência aos azóis, como o fluconazol, e às equinocandinas, respectivamente (ARENDRUP, 2014). Uma possível explicação para essa mudança no perfil de resistência farmacológica seria o uso abusivo dos azóis, como na profilaxia com fluconazol em pacientes com maior risco de desenvolver candidíases invasivas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

1.4.2 As infecções causadas por dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos que invadem tecidos queratinizados – escamas, pele, pelos, penas e unhas do corpo de homens e animais, degradando a queratina sob ação de queratinases (TORTORA *et al.*, 2012). Taxonomicamente, os dermatófitos compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (TORTORA *et al.*, 2012). Em geral, os gêneros *Microsporum* e *Epidermophyton* parasitam preferencialmente pele e pelos; *Trichophyton* spp. parasita pele, pelos e unhas (ZAITZ *et al.*, 2010).

Os dermatófitos causam infecções superficiais denominadas de dermatofitoses, popularmente conhecidas como tinhas, sendo estas muito comuns em indivíduos do sexo masculino e de maior incidência em populações fechadas, como tripulações de navios e creches (ZAITZ *et al.*, 2010). O homem pode desenvolver dermatofitose por contato direto com outras pessoas, animais ou solo contaminados, ou de forma indireta por exposição a fômites contaminados (ZAITZ *et al.*, 2010).

As dermatofitoses são classificadas em tinhas – acometem o couro cabeludo e as áreas de barba e bigode, epidermofitíases – lesões no extrato córneo da pele glabra, onicomicoses dermatofíticas – infecções das unhas das mãos e dos pés, e dermatofitoses subcutâneas – infecções das camadas profundas da pele (SIDRIM *et al.*, 2004). As tinhas de couro cabeludo têm alta incidência na população pediátrica e estão relacionadas geralmente com hábitos de higiene precários (ZAITZ *et al.*, 2010). As epidermofitíases abrangem principalmente as lesões dos espaços interdigitais dos pés – *tinea pedis*, o conhecido “pé de atleta”, e são frequentes em indivíduos que têm maior contato com piscinas e uso de sapatos esportivos (FLINT & CAIN, 2014). As onicomicoses afetam aproximadamente 6 a 13% dos indivíduos, principalmente idosos e diabéticos, e são de difícil diagnóstico (FLINT & CAIN, 2014; NENOFF *et al.*, 2014). O tratamento das onicomicoses é difícil e demorado devido à alta densidade da queratina das unhas, à baixa vascularização da área e ao lento crescimento das unhas, contribuindo para a baixa adesão do paciente ao tratamento (SIDRIM *et al.*, 2004).

1.5 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

O número de fármacos antifúngicos disponíveis no mercado atualmente é limitado quando comparado com o arsenal terapêutico antibacteriano (BUTTS & KRYSAN, 2012). Há um descompasso entre o aumento mundial do número de casos de micoses e a pequena quantidade de antifúngicos disponíveis (ZAITZ *et al.*, 2010).

Os fármacos considerados padrão-ouro para o tratamento da meningite criptocócica, infecção fúngica grave que mata mais de 650.000 pessoas por ano no mundo, ainda são anfotericina B e flucitosina, antifúngicos descobertos há cerca de cinquenta anos (BUTTS & KRYSAN, 2012). Apenas esses dois fármacos eram disponíveis para o tratamento de micoses sistêmicas antes do lançamento dos derivados azólicos na década de 1970 (COLOMBO & ALVES, 2004). E, apesar da evolução da terapia antifúngica nesses últimos anos, o desenvolvimento de resistência, principalmente em pacientes imunocomprometidos, preocupa a comunidade científica (ZAITZ *et al.*, 2010). Soma-se a isso a dificuldade em desenvolver fármacos com ações específicas contra a célula fúngica, visto que as células de fungos e seres humanos são eucarióticas (ZAITZ *et al.*, 2010). Grande parte dos antifúngicos disponíveis atua na biossíntese da membrana plasmática fúngica ou diretamente nela (Figura 14) (COLOMBO & ALVES, 2004).

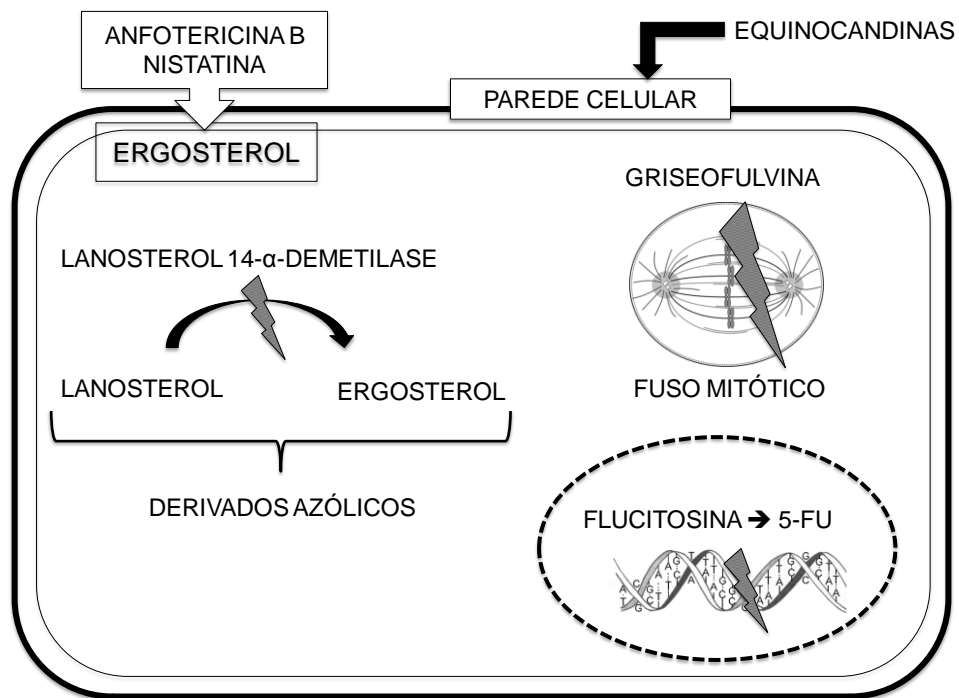


Figura 14 – Esquema geral dos principais fármacos (anfotericina B, nistatina, griseofulvina e flucitosina) e classes (equinocandinas e azólicos) utilizados na terapia antifúngica e seus mecanismos de ação. Fonte: pharmacologycorner.com (traduzido e adaptado).

1.5.1 Agentes antifúngicos derivados de produtos naturais

1.5.1.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrolídico poliênico produzido por *Streptomyces nodosus* (Figura 15) (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

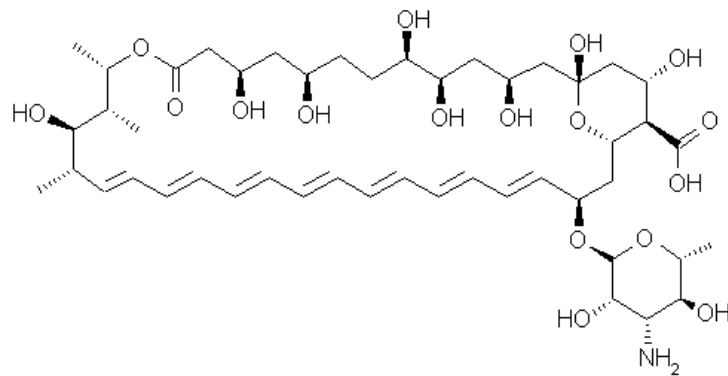


Figura 15 – Estrutura molecular da anfotericina B.

A anfotericina B é o agente antifúngico de maior espectro de ação, tendo atividade em leveduras – *Candida* spp., e fungos filamentosos – *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *Aspergillus* spp., e é também ativa em protozoários – *Leishmania* spp. (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). É considerada o padrão-ouro para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas devido ao seu amplo espectro de ação e à sua atividade fungicida (DI SANTO, 2010).

O mecanismo de ação da anfotericina B consiste em se ligar ao ergosterol da membrana, formando-se poros que aumentam a permeabilidade da membrana e facilitam o extravasamento de íons e moléculas intracelulares importantes para a homeostase (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

A reação adversa mais relevante decorrente da toxicidade cumulativa do fármaco é a lesão renal (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). Com o objetivo de aumentar a tolerabilidade do paciente, foram lançadas três formulações lipídicas menos nefrotóxicas que a formulação convencional: complexo lipídico, dispersão coloidal e lipossomal. Essas novas formulações podem ser administradas em doses maiores devido à sua maior margem de segurança, porém a principal limitação para seu uso é o custo, bem maior que o da anfotericina B convencional (SIDRIM & ROCHA, 2004).

1.5.1.2 Nistatina

A nistatina (Figura 16) também é pertencente à classe dos antifúngicos poliênicos, apresentando o mesmo mecanismo de ação da anfotericina B (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

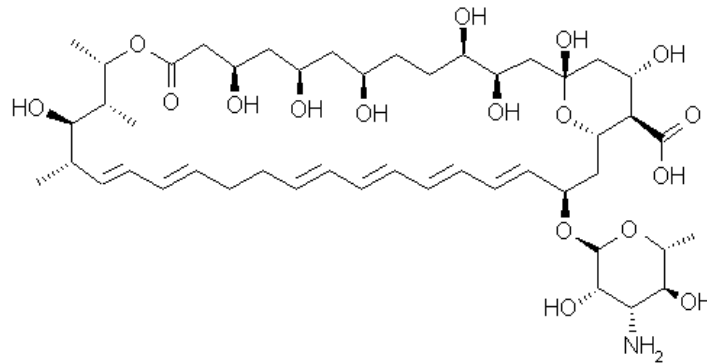


Figura 16 – Estrutura molecular da nistatina.

A nistatina é muito utilizada no tratamento de infecções de pele e mucosas, principalmente candidíase vulvovaginal, provocadas por espécies de *Candida* spp., sendo administrada comumente por via tópica sob a forma de pomadas e cremes vaginais (ZAITZ *et al.*, 2010).

1.5.1.3 Equinocandinas

As equinocandinas são grandes peptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo de cadeia longa (Figura 17) (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

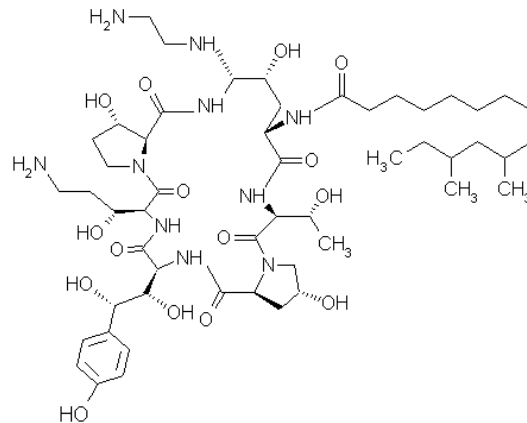


Figura 17 – Estrutura molecular da caspofungina, uma equinocandina.

Trata-se de uma classe recente de antifúngicos representada especialmente por caspofungina, micafungina e anidulafungina (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). Esses três fármacos são derivados semissintéticos de equinocandinas isoladas de fungos, como o *Aspergillus rugulovalvus* que produz a caspofungina B (DI SANTO, 2010; VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

As equinocandinas são fungicidas em *Candida* spp. e fungistáticas em *Aspergillus* spp. (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Os usos aprovados para caspofungina são para o tratamento de infecções disseminadas e mucocutâneas causadas por *Candida* spp.; a micafungina é indicada para candidíase mucocutânea e para profilaxia de infecções por *Candida* spp. em pacientes transplantados de medula óssea; a anidulafungina é utilizada em casos de candidíase esofágica e de candidíase invasiva, incluindo septicemia (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

Essa classe de antifúngicos é considerada única devido ao seu alvo de ação diferenciado: a parede celular (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). A cadeia lateral lipídica das equinocandinas inibe irreversivelmente a síntese do (1,3)- β -D-glucano, um polissacarídeo essencial da parede celular fúngica, levando à depleção dos polímeros de glucano, à instabilidade osmótica e, conseqüentemente, à lise da parede celular (DI SANTO, 2010; VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

1.5.1.4 Griseofulvina

A griseofulvina é um antibiótico antifúngico produzido por espécies do gênero *Penicillium* (Figura 18) (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

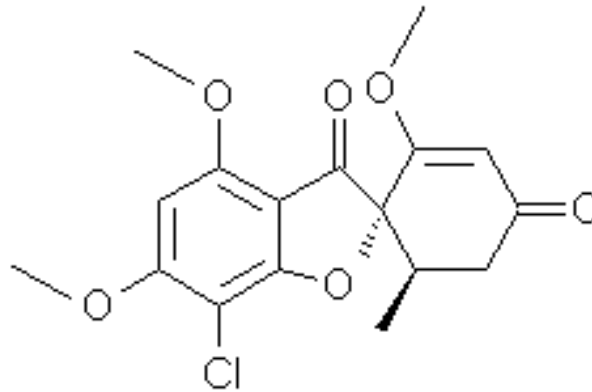


Figura 18 – Estrutura molecular da griseofulvina.

Trata-se de um fungistático utilizado no tratamento sistêmico de dermatofitoses, pois seu espectro de ação é restrito principalmente aos dermatófitos – *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. verrucosum*, *E. floccosum*, *M. canis* e *M. gypseum* (DI SANTO, 2010; SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). A griseofulvina é efetiva no tratamento de tinhas do couro cabeludo ou barba e nas infecções de pele glabra (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). Seu principal efeito adverso é a hepatotoxicidade (DI SANTO, 2010).

A griseofulvina é um fármaco anti-mitótico: induz a despolimerização dos microtúbulos, desfazendo o fuso mitótico o que, conseqüentemente, impede a progressão da mitose (ZACHARAKI *et al.*, 2013).

1.5.2 Agentes antifúngicos sintéticos

1.5.2.1 Derivados azólicos

Os azólicos são os antifúngicos mais utilizados mundialmente, pois se destacam pelo seu amplo espectro de ação, boa biodisponibilidade oral e baixa toxicidade (DI SANTO, 2010; VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Em geral, os azólicos possuem atividade clinicamente significativa em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis* e dermatófitos (BENNETT, 2005). Os principais azólicos administrados por via oral são fluconazol e itraconazol (Figura 19) (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

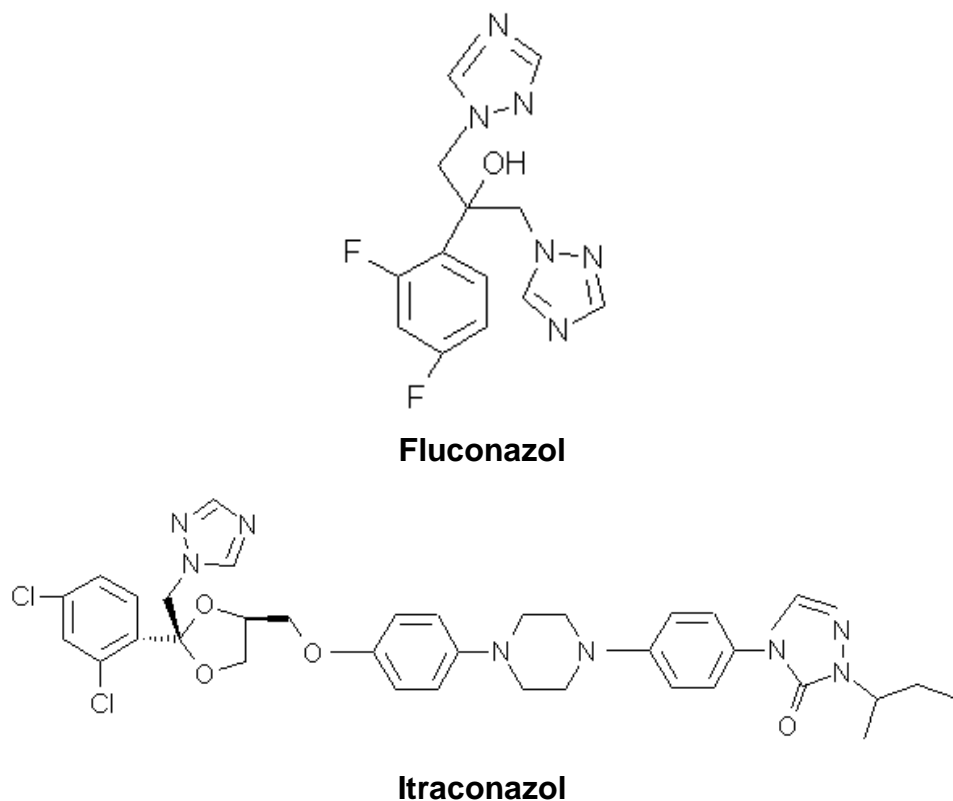


Figura 19 – Estruturas moleculares do fluconazol e itraconazol.

O itraconazol é indicado principalmente no tratamento de dermatofitoses, como as onicomioses, aspergiloses e paracoccidioidomicoses; o fluconazol é o azólico de escolha no tratamento e na profilaxia secundária de meningite criptocócica e também no tratamento de candidíase mucocutânea, orofaríngea, esofágica e vulvovaginal (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). Ao contrário do itraconazol, o fluconazol não possui atividade em fungos filamentosos (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

A ação antifúngica dos azólicos consiste em aumentar a permeabilidade da membrana plasmática da célula fúngica por meio da inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase, que participa da biossíntese do ergosterol por meio da desmetilação do carbono 14 do precursor lanosterol, levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis que, quando metabolizados, geram compostos tóxicos (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Por consequência, ocorrem alteração da fluidez da membrana plasmática e aumento de sua permeabilidade, comprometendo o funcionamento de sistemas enzimáticos, como a ATPase e as enzimas do sistema de transporte de

elétrons (DI SANTO, 2010). Os azólicos, portanto, têm ação fungistática, pois apenas inibem o crescimento fúngico.

1.5.2.2 Terbinafina

A terbinafina é um fármaco fungicida eficaz no tratamento de dermatofitoses (Figura 20) (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

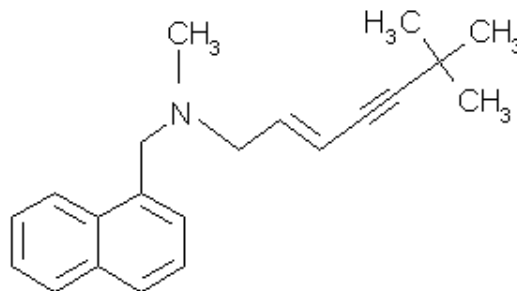


Figura 20 – Estrutura molecular da terbinafina.

É utilizada na terapia de onicomicoses causadas por *T. rubrum*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*, sendo inclusive mais efetiva do que griseofulvina e itraconazol quando administrada por via oral (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

Assim como os derivados azólicos, a terbinafina atua na biossíntese do ergosterol; entretanto, inibe outra enzima, a esqualeno epoxidase, levando ao acúmulo de esqualeno, um esterol tóxico, na parede da célula fúngica (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010).

1.5.2.3 Flucitosina

A flucitosina ou 5-fluorocitosina é um análogo sintético do nucleotídeo citosina (Figura 21) (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

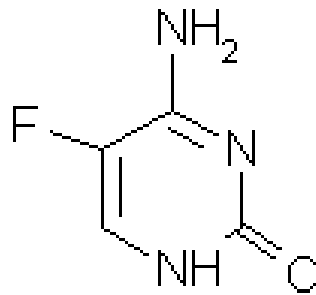


Figura 21 – Estrutura molecular da flucitosina.

O fármaco apresenta aplicabilidade clinicamente relevante no tratamento de micoses profundas causadas por algumas espécies de *Candida* spp. (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2010). Na maioria dos casos, a flucitosina é utilizada em combinação com a anfotericina B devido à ocorrência frequente de fungos com resistência inata ou adquirida ao fármaco (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

A flucitosina atua em nível de DNA e RNA, inibindo a síntese desses ácidos nucleicos (BENNETT, 2005). Após ser transportado para a célula, o fármaco é desaminado em 5-fluorouracila pela enzima citosina desaminase. A 5-fluorouracila é convertida em 5-fluorouracila monofosfato, que por sua vez pode ser transformada em 5-fluorouracila trifosfato, que é incorporada no RNA, inibindo a síntese proteica, ou em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato, que inibe a timidilato sintase, uma enzima importante envolvida na replicação do DNA (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Como as células de mamíferos não possuem a citosina desaminase, elas não são capazes de converter a flucitosina em 5-fluorouracila – aspecto importante para a seletividade do antifúngico e também para a baixa toxicidade do fármaco no homem (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

1.6 BUSCA DE NOVOS ANTIFÚNGICOS DE ORIGEM VEGETAL

O aumento da incidência mundial das infecções fúngicas e o surgimento de cepas resistentes a agentes terapêuticos apontam para a necessidade de investigar novas substâncias que tenham mecanismos de ação inéditos e/ou complementares

aos dos fármacos existentes (FAVRE-GODAL *et al.*, 2014). Os produtos naturais são alternativas para a busca dessas substâncias devido à sua complexidade e diversidade moleculares e às suas atividades biológicas muitas vezes seletivas e específicas (CRAGG & NEWMAN, 2013).

Dentre os inúmeros metabólitos secundários bioativos de plantas, muitos funcionam como mecanismos de defesa do vegetal contra micro-organismos, insetos e herbívoros (ARIF *et al.*, 2009). Os taninos, por exemplo, funcionam como mecanismos de defesa natural contra infecções microbianas, impedindo a predação de herbívoros e o ataque de micro-organismos, e protegendo tecidos vegetais, como a madeira, do apodrecimento. Sugere-se que os mecanismos de ação dos taninos estejam relacionados com: a capacidade de precipitar proteínas, inibição de enzimas microbianas extracelulares e adesinas, complexação com substratos requeridos para o crescimento microbiano, inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, alteração da integridade da membrana plasmática, e precipitação de íons metálicos, alterando o funcionamento de metaloenzimas essenciais ao metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991; CHUNG *et al.*, 1998; COWAN, 1999).

Os flavonóides também atuam como antimicrobianos em plantas, possivelmente devido à capacidade de se complexarem com proteínas extracelulares e com as paredes celulares (COWAN, 1999; ORHAN *et al.*, 2010). Em um estudo realizado por YORDANOV *et al.* (2008), os flavonóides apigenina e kaempferol inibiram a atividade de enzimas extracelulares – proteinases e lipases de *C. albicans*, fatores de virulência responsáveis pela invasão da levedura nos tecidos do hospedeiro.

1.7 BUSCA DE NOVOS ANTITUMORAIS DE ORIGEM VEGETAL

As altas taxas de morbidade e mortalidade mundiais associadas ao câncer, o desenvolvimento de resistência de células tumorais a quimioterápicos e as graves reações adversas causadas por esses agentes terapêuticos reforçam a necessidade de investigar novos antitumorais mais eficazes (LIU *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários vegetais e seus derivados semissintéticos e sintéticos também são fontes importantes de novos agentes antitumorais (DE MESQUITA *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides,

possuem amplo espectro de ação em diversas vias metabólicas envolvidas com o câncer, atuando como antioxidantes, anti-inflamatórios e inibidores da proliferação celular e da angiogênese (WAHL *et al.*, 2011).

Estima-se que mais de 60% dos antitumorais empregados na quimioterapia são derivados de produtos naturais, sejam de plantas, organismos marinhos ou micro-organismos (CRAGG & NEWMAN, 2005). Existem quatro classes principais de substâncias antitumorais derivadas de plantas muito utilizadas na clínica: os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina) isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), os derivados semissintéticos (etoposídeo e teniposídeo) da epipodofilotoxina isolada de espécies do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae), os diterpenos taxanos (paclitaxel e docetaxel) oriundos de espécies do gêneros *Taxus* (Taxaceae) e os derivados semissintéticos da camptotecina (topotecano e irinotecano) isolada de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) (PAN *et al.*, 2010).

Considerando que na medicina tradicional o óleo extraído da casca e dos frutos de *A. fraxinifolium* é cáustico e irritante, sendo empregado no tratamento de calos (BRAGA, 1976), sugeriu-se que substâncias isoladas dessa espécie pudessem apresentar propriedade citotóxica.

Estima-se que apenas 6% das cerca de 300.000 espécies de plantas superiores foram pesquisadas quanto aos aspectos farmacológicos e somente 15% foram pesquisadas quanto aos aspectos fitoquímicos (CRAGG & NEWMAN, 2013). O Brasil abriga aproximadamente 24% do total de plantas superiores, além de deter extenso conhecimento do uso de plantas medicinais, acumulado ao longo dos anos pelos povos indígenas e pelas comunidades tradicionais (BRASIL, 2006). Em 2006, o governo federal, por meio do Decreto no. 5.813, aprovou a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) que visa, dentre inúmeros outros objetivos, fomentar o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais, dado o grande potencial do País nessa área. O Cerrado é um bioma atrativo para essa pesquisa, pois possui abundância de espécies nativas com grande diversidade química.

1.8 O BIOMA CERRADO

O Cerrado detém 5% da biodiversidade do planeta e é o segundo maior bioma do país e da América do Sul em extensão depois da Amazônia, ocupando aproximadamente 24% do território nacional – uma área total estimada em mais de dois milhões de km² (MMA, 2011). É considerado o “berço das águas” por abrigar nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul – Araguaia-Tocantins, São Francisco e Paraná – o que contribui para a manutenção de sua biodiversidade (RIBEIRO *et al.*, 2005).

No território brasileiro, o Cerrado distribui-se de forma contínua na região do Planalto Central, abrangendo o Distrito Federal e os estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Bahia, Piauí, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (MMA, 2011). O bioma também se distribui como área disjunta na Floresta Amazônica, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa (HENRIQUES, 2005). Além disso, pode ser encontrado também no Paraguai e na Bolívia (MMA, 2011).

O clima predominante no Cerrado é o tropical sazonal com duas estações bem definidas: invernos secos que duram de maio a setembro e verões chuvosos que ocorrem de outubro a abril (FRANCO, 2005). Em razão da grande diversidade de seus solos, da topografia e dos climas na região central brasileira, o Cerrado possui diferentes fitofisionomias (MMA, 2011). Ao todo, existem 11 tipos de vegetação encontradas no bioma: Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão (formações florestais); Cerrado Sentido Restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda (formações savânicas); Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre (formações campestres) (RIBEIRO & WALTER, 2008). O Cerrado Sentido Restrito ou *Sensu Stricto* ocupa grande parte do bioma, aproximadamente 70%, sendo formado por um estrato herbáceo dominado por gramíneas e um estrato de árvores e arbustos (FELFILI & SILVA JÚNIOR, 2005). A Figura 22 mostra algumas dessas fitofisionomias.



Figura 22 – Fotos das fitofisionomias: (a) Cerradão. (b) Cerrado Sentido Restrito. (c) Campo Sujo. Fonte: www.icmbio.gov.br.

Até o momento foram catalogadas 385 espécies de pteridófitas e 11.242 espécies de fanerógamas (MENDONÇA *et al.*, 2008). O complexo vegetacional se desenvolve em vários tipos de solo, sendo que a maioria destes são bem drenados, profundos, ácidos, com baixa disponibilidade de nutrientes e com elevada concentração de alumínio (FELFILI & SILVA JÚNIOR, 2005). Sabe-se que a flora do Cerrado é resistente ao fogo e possui as adaptações estruturais necessárias para sua sobrevivência principalmente na estação seca, tais como cascas de cortiça grossas, xilopódios, folhas espessas, entre outras (RATTER *et al.*, 1997).

O Cerrado é alvo do desmatamento intenso, pois é propício para a prática de atividades agrárias, principalmente de grãos, como a soja e o milho, e da cana-de-açúcar, pecuária e produção de carvão vegetal (MMA, 2011). Segundo dados do Centro de Sensoriamento Remoto do IBAMA, o bioma perdeu quase metade, o equivalente a 48,54%, de sua vegetação nativa até 2010 (Figura 23) (IBAMA, 2011).

Em números absolutos, essa porcentagem equivale a 989.917 Km² de cobertura vegetal suprimida, considerando a área total do bioma de 2.039.386 Km² (IBAMA, 2011). Calcula-se que 54 milhões de hectares do bioma são ocupados por pastagens cultivadas e 21,56 milhões de hectares por cultivos agrícolas (MMA, 2011). Em decorrência das atividades agropecuárias, o Cerrado está exposto a inúmeras ameaças: uso descontrolado do fogo na estação seca para limpar o pasto, emprego de contaminantes ambientais, como pesticidas e herbicidas, erosão dos solos e assoreamento dos cursos d'água (ALHO, 2005).

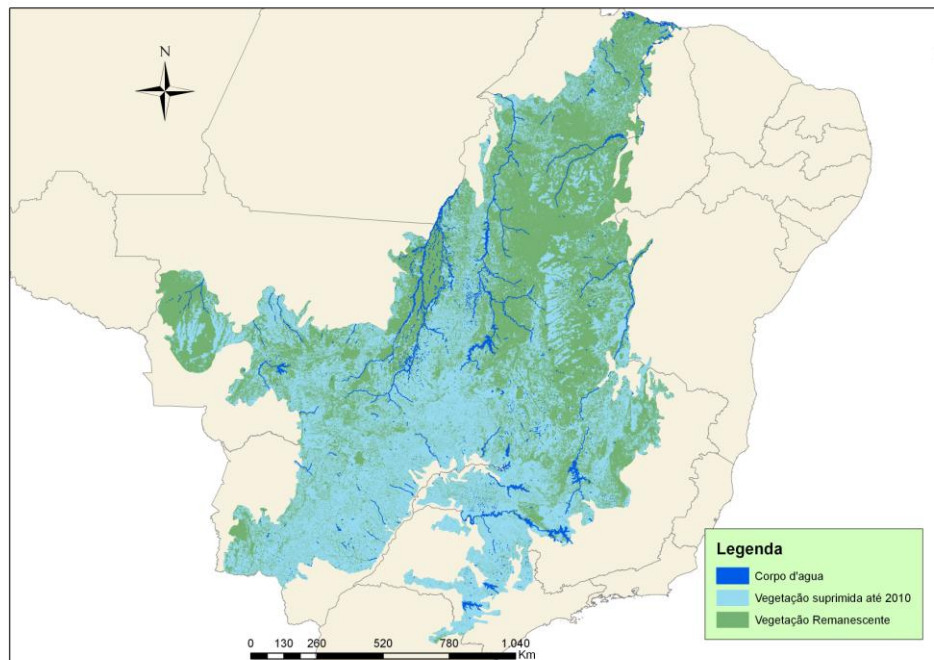


Figura 23 – Distribuição geográfica da vegetação suprimida pela ação antrópica até 2010 e da vegetação remanescente. Fonte: IBAMA, 2011.

Diante desse quadro, o Cerrado é considerado um *hotspot*, ou seja, uma área que apresenta grande diversidade de espécies endêmicas e que experimenta destruição significativa de *habitats* (MYERS *et al.*, 2000). Ao contrário das espécies de distribuição geográfica ampla, as espécies endêmicas têm distribuição mais restrita, são mais especializadas e mais susceptíveis à extinção decorrente da ação antrópica (ALHO, 2005). Existem poucas unidades de conservação federais, estaduais e municipais do Cerrado – apenas 7,44% (IBAMA, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o potencial farmacológico dos extratos brutos e substâncias isoladas de *Astronium fraxinifolium* Schott.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos de *A. fraxinifolium* em leveduras e dermatófitos;
- Realizar o fracionamento químico dos extratos de *A. fraxinifolium* que apresentarem melhor atividade e polaridade adequada;
- Elucidar os constituintes químicos isolados;
- Determinar os valores de CIM das substâncias isoladas em leveduras;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro*, com determinação da Concentração Inibitória 50% (CI_{50} $\mu\text{g/mL}$) das substâncias isoladas de *A. fraxinifolium* em quatro linhagens de células tumorais: HL-60 (leucemia), OVCAR-8 (ovário), SF-295 (glioblastoma) e HCT-116 (côlon).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) foi coletada no Cerrado, no Parque Alvorada em Luziânia/DF, latitude sul 16° 12' 51"; longitude oeste 47° 56' 11,6'; altitude 1.009 m. O botânico Prof. Dr. José Elias de Paula foi responsável pela identificação. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB) sob o número UB 3814.

3.2 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os órgãos vegetais de *A. fraxinifolium* coletados foram encaminhados ao Laboratório Prof. José Elias de Paula – anexo do Laboratório de Farmacognosia/UnB – e separados em folhas, casca e madeira do caule, casca e madeira da raiz. Após dessecação e estabilização em temperatura ambiente e ao abrigo do sol (Figura 24a), as partes da planta foram pulverizadas em moinho de facas (Figura 24b).



Figura 24 – (a) Dessecação e estabilização dos órgãos vegetais. (b) Moinho de facas utilizado para pulverização dos órgãos vegetais. Fonte: Arquivo do Laboratório de Farmacognosia/UnB

Os órgãos vegetais pulverizados foram pesados e submetidos ao processo de extração por maceração com solventes de diferentes polaridades: hexano, acetato de etila e etanol (Figura 25a). O volume de solvente adicionado seguiu a proporção volumétrica de duas partes de solvente para uma parte de material pulverizado. A maceração foi realizada por um período de 4 semanas e, ao final de cada semana,

recuperou-se a solução extrativa por meio de filtração simples e renovou-se o solvente (Figura 25b). A solução extrativa recuperada foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida e a 40 °C, e dessecada para obtenção do extrato bruto (Figura 25c). Depositaram-se os extratos a -20 °C no Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado (Figura 25d). A atividade de acesso ao patrimônio genético é autorizada sob o nº 06/2012 de acordo com a Resolução CGEN Nº 35, após análise vinculada às informações e termos do processo 02000.002272/2006-73.



Figura 25 – (a) Processo de extração por maceração. (b) Obtenção da solução extrativa por filtração. (c) Concentração da solução extrativa em evaporador rotatório. (d) Depósito dos extratos a -20 °C. Fonte: Arquivo do Laboratório de Farmacognosia/UnB

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.3.1 Obtenção e manutenção dos fungos

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica foram realizados com cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos LMGO (Laboratório de Micologia de Goiás) de leveduras e dermatófitos. Os isolados clínicos são

provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). A tabela 2 mostra as cepas e isolados clínicos de leveduras e dermatófitos e seus respectivos códigos.

Tabela 2 – Cepas e isolados clínicos utilizados na avaliação da atividade antifúngica.

Tipo de fungo	Espécie	Código
LEVEDURAS	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 LMGO 102
	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
	<i>Candida glabrata</i>	LMGO 44
DERMATÓFITOS	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9533 LMGO 09
	<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC 28189 LMGO 08

Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio em meio ágar batata dextrose (Acumedia®) inclinado a temperatura ambiente. O repique de manutenção das cepas foi realizado quinzenalmente.

3.3.2 Teste de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A finalidade deste teste é determinar a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento visualmente perceptível de micro-organismos. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) é o responsável pelo estabelecimento e emissão dos protocolos-padrão. Para a realização do teste de microdiluição foram utilizados os protocolos M27-A3 para leveduras e M38-A2 para fungos filamentosos.

3.3.3 Preparo do meio de cultura RPMI 1640

O meio de cultura utilizado no teste de microdiluição foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640; Sigma-Aldrich®) com L-glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato de sódio. Apresentado como pó desidratado, o meio (10,4 g)

foi dissolvido em 900 mL de água destilada. O meio foi tamponado com ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165 mol/L para pH 7 com auxílio de um potenciômetro. Após o ajuste de pH, acrescentou-se mais 100 mL de água destilada para produzir 1 L de meio. Em seguida, o meio preparado foi esterilizado em sistema de filtração a vácuo com membrana com poros de 0,22 μm (TPP[®]) em capela de fluxo laminar. Três alíquotas do meio finalizado foram incubadas a 37 °C por 5 dias para observação de possíveis contaminações, como presença de turbidez. Findo o período de incubação, o meio pode ser utilizado nos testes. O meio RPMI 1640 tem validade de 2 semanas e deve ser armazenado a 4 °C na geladeira.

3.3.4 Preparo das amostras

Os extratos foram pesados e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter uma solução-mãe na concentração de 100 mg/mL. No teste, a solução-mãe é diluída em meio RPMI, obtendo-se uma solução-teste a 4000 $\mu\text{g/mL}$. A concentração final de DMSO em cada poço é menor que 5% (v/v).

3.3.5 Preparo dos controles positivos

Fluconazol (Sigma-Aldrich[®]) e itraconazol (Sigma-Aldrich[®]) foram utilizados como controles positivos do teste. No caso do teste com leveduras, os dois controles foram empregados e no teste com fungos filamentosos, utilizou-se somente o itraconazol.

Segundo os protocolos do CLSI, o fluconazol, solúvel em água, foi preparado a uma concentração de 640 $\mu\text{g/mL}$. Essa concentração equivale a 10 vezes a concentração final a ser testada, 64 $\mu\text{g/mL}$. O itraconazol, solúvel em DMSO e insolúvel em água, foi preparado a 1600 $\mu\text{g/mL}$, uma concentração 100 vezes maior que a concentração a ser testada, 16 $\mu\text{g/mL}$. A concentração final do itraconazol e do fluconazol foi obtida por diluição em meio RPMI.

3.3.6 Preparo do inóculo de leveduras

Para o preparo do inóculo, as leveduras foram repicadas, em meio ágar batata dextrose, 48 h antes da realização do teste. O repique de 48 h é importante

para verificar a pureza e a viabilidade da cultura e para obter um inóculo com número adequado de estruturas jovens em fase logarítmica de crescimento.

Com o auxílio de uma alça de platina, o fungo foi retirado do meio de cultura e transferido para um tubo de ensaio com solução salina estéril a 0,85% até que a suspensão atingisse a turbidez de 0,5 na escala de McFarland – o que corresponde a, aproximadamente, 5×10^6 células/mL. Posteriormente, a suspensão foi diluída em meio RPMI em duas etapas. A primeira diluição seguiu a proporção de 1:50 – 1 parte da solução salina para 49 partes de meio RPMI, produzindo uma solução intermediária. A segunda diluição foi realizada na proporção de 1:20 – 1 parte da solução intermediária para 19 partes de meio RPMI, resultando em um inóculo de concentração de $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. Após o acréscimo do inóculo na placa de microdiluição, a concentração final de cada poço foi de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.3.7 Preparo do inóculo de fungos filamentosos

Os dermatófitos foram repicados 5 a 7 dias antes da realização do teste para verificar a pureza e a viabilidade da cultura. Para o preparo do inóculo, transferiu-se solução salina estéril 0,85% para o tubo de ensaio contendo o fungo. Com o auxílio de uma alça de platina, raspou-se a superfície do fungo até que a solução atingisse a turbidez de 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi diluída em meio RPMI em apenas uma etapa seguindo a proporção de 1:10 – uma parte da suspensão para 9 partes de meio RPMI. A diluição produziu um inóculo final cuja concentração varia de $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL.

3.3.8 Técnica de microdiluição

O teste de microdiluição foi realizado em placas estéreis de 96 poços com fundo em “U” para melhor visualização do crescimento fúngico no fundo do poço. De início, 100 μ L de meio RPMI foram adicionados em todos os poços com o auxílio de uma pipeta multicanal (Figura 26).



Figura 27 – Adição das amostras e dos controles positivos à placa de microdiluição.

Com auxílio de pipeta multicanal, regulada para 100 μ L, foi realizada a diluição seriada (Figura 28) até a antepenúltima coluna (coluna 10), desprezando-se, ao final, os 100 μ L restantes.



Figura 28 – Diluição seriada das amostras e dos controles positivos na placa de microdiluição.

Um volume de 100 μ L de inóculo foi acrescentado em todas as colunas, com exceção da última coluna (Figura 26). Esta é o controle de esterilidade do teste, contendo somente o meio RPMI, sendo o controle negativo do teste. A penúltima

coluna (coluna 11) é o controle de crescimento, pois contém o inóculo e o meio de cultura (Figura 26). O teste foi realizado em duplicata.

As placas foram então vedadas com parafilme separadamente e incubadas a 35 °C por 48 h, no caso das leveduras, e por 5 dias, para fungos filamentosos.

3.3.9 Leitura dos resultados para determinação da CIM

A leitura dos resultados foi feita visualmente da direita para a esquerda, observando o crescimento fúngico no fundo dos poços e comparando com os poços do controle de crescimento. O primeiro poço em que não houve crescimento foi considerado como sendo o valor do CIM. Caso não houvesse crescimento em todos os poços (CIM de 1000 a 1,95 µg/mL), um novo teste era realizado com uma concentração inicial menor que 1000 µg/mL no primeiro poço.

O critério de leitura dos controles positivos – fluconazol e itraconazol – levou em consideração a inibição de 80% do crescimento fúngico. O fungo *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi selecionado como cepa-padrão para o controle de qualidade do método padronizado segundo as normas do CLSI (CLSI, 2008a).

3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO*

As linhagens tumorais humanas utilizadas – HL-60 (leucemia), OVCAR-8 (ovário), SF-295 (glioblastoma) e HCT-116 (côlon) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e foram testadas na maior concentração de 25 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do MTT, descrito primeiramente por MOSMANN (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células vivas.

As células tumorais foram plaqueadas nas concentrações de $0,3 \times 10^6$ células/mL para a linhagem HL-60; $0,1 \times 10^6$ células/mL para as linhagens OVCAR-8 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ células/mL para a linhagem HCT-116. Após 24 h, as amostras foram adicionadas com o auxílio do equipamento HTS – *High-Throughput Screening* (Biomek 3000 – Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA). As placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término de 72 h de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT e as placas foram reincubadas por 3 h. Após esse período, o precipitado foi dissolvido com 150 µL de DMSO puro. Para a quantificação do sal de MTT reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinada a concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa *GraphPad Prism*.

3.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

3.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A Cromatografia em Camada Delgada foi utilizada para avaliar qualitativamente o perfil químico do extrato, das frações e grupos, acompanhar o andamento do fracionamento cromatográfico e auxiliar a reunião das frações com perfil semelhante. Placas de sílica gel 60 de 0,20 mm de espessura com indicador de fluorescência UV 254 nm (Macherey-Nagel®) foram utilizadas. As amostras diluídas em solvente apropriado foram aplicadas na placa a 1 cm da base com auxílio de um capilar de vidro. As placas foram eluídas com um solvente adequado ou em um sistema de solventes. Ao final, as placas foram expostas a luz ultravioleta para observação de fluorescência e borrifadas com vanilina sulfúrica para a revelação química das bandas formadas.

3.5.2 Cromatografia em Coluna Sephadex LH 20

O fracionamento cromatográfico em coluna Sephadex – coluna de gel de dextran hidroxipropilado – obedece ao princípio da diferença de tamanho molecular: as moléculas maiores são eluídas primeiro; as menores, por ficarem retidas na resina, demoram mais tempo para serem eluídas. O extrato acetato de etila da casca da raiz foi fracionado em coluna Sephadex LH 20 (Sigma[®]) utilizando apenas o metanol como eluente. Ao final, obteve-se sete frações (F1 a F7).

3.5.3 Cromatografia em Coluna Aberta de Sílica

3.5.3.1 Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *A. fraxinifolium*

As frações F4 a F7, obtidas da coluna Sephadex, foram reunidas e submetidas à partição água/diclorometano. A fração diclorometânica foi recuperada e reunida às frações F1 a F3, obtidas da coluna Sephadex. Em seguida, essa amostra foi fracionada em coluna aberta de sílica gel (Vetec[®], 70-230 mesh) na proporção de 1 g de material para 80 g de sílica. Iniciou-se o processo de separação com 100% de hexano, aumentando gradativamente de 5% em 5% a polaridade com diclorometano até este atingir 100%. Em seguida, a polaridade continuou sendo aumentada aos poucos com metanol – com variações de 0,1%, 1% e 10% - até alcançar 100%. A reunião das frações em grupos foi realizada segundo o perfil em CCD. As 412 frações obtidas foram reunidas em 60 grupos. Os grupos G15 e G16 foram reunidos e submetidos à Cromatografia Líquida de Média Pressão. O fracionamento foi realizado em coluna Interchim PuriFlash[™] 25 g – 22 bars P/N: IR 50 SI/25 g Upti – prep. sílica technology[™] 50 µm com fluxo de 15 mL/minuto. Gradientes de ciclohexano e diclorometano foram empregados como fase móvel. A reunião das frações em grupos foi realizada segundo o perfil em CCD.

3.5.3.2 Fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de *A. fraxinifolium*

O extrato acetato de etila das folhas foi fracionado em coluna aberta de sílica gel (Vetec[®], 70-230 mesh), utilizando como fase móvel gradientes de ciclohexano, diclorometano e metanol. Um total de 166 frações obtidas foram reunidas em 18

grupos. Os grupos G5, G6 e G7 foram reunidos e fracionados em sílica com ciclohexano, clorofórmio e metanol, obtendo-se ao final 745 frações reunidas em 124 grupos. Os grupos G10 e G11 foram reunidos e fracionados em sílica com ciclohexano e acetato de etila, resultando em 143 frações reunidas em 7 grupos. Destes, o grupo G5 foi fracionado em sílica com ciclohexano e acetato de etila, obtendo-se 67 frações reunidas em 11 grupos. A reunião das frações em grupos foi realizada segundo o perfil em CCD.

3.5.4 Cromatografia Gasosa (CG)

Os grupos G5, proveniente do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz, G6 e G51, provenientes do fracionamento do extrato acetato de etila das folhas – foram submetidos à cromatografia gasosa. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu[®] modelo QP-2010, equipado com coluna DB-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm *Agilent Technologies*) e detector de espectrometria de massas (CG-EM). A injeção em modo Split (1:20) foi realizada com injetor a 260 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste em fluxo de 1 mL/min. A programação da temperatura do forno foi iniciada em 200 °C, mantida por 12 min, e finalizada em 290 °C por 35 min, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. O modo de aquisição foi do tipo SCAN e o tempo de corrida foi de 56 min. Como modo de ionização, empregou-se a ionização eletrônica (EI) com energia de 70 eV.

3.6 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

3.6.1 Espectrometria de Massas

Utilizou-se espectrômetro de massas ZQ 2000 (Waters[®]) no modo positivo.

3.6.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a elucidação da estrutura química das substâncias isoladas, utilizou-se espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 400 MHz (Bruker[®]). Para a

análise, as amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Ao final, foram obtidos espectros de RMN ^1H , HSQC, HMBC e COSY.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *A. fraxinifolium*

Os treze extratos de *A. fraxinifolium* testados em leveduras e dermatófitos são pertencentes ao Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB. Destes, 3 extratos eram da casca do caule, 3 da casca da raiz, 2 da madeira do caule, 3 da madeira da raiz e 2 das folhas. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos em leveduras e dermatófitos encontram-se na tabela 3.

Na literatura, ainda não há consenso quanto ao valor de CIM que deve ser considerado para classificar um extrato como promissor para o isolamento de substâncias antifúngicas. Webster *et al.* (2008) consideram um extrato com forte potencial antifúngico aquele cujo valor de CIM é menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Segundo Ríos & Recio (2005), têm atividade os extratos com concentrações menores que 100 $\mu\text{g/mL}$ e substâncias isoladas com concentrações menores que 10 $\mu\text{g/mL}$. O grupo do Laboratório de Farmacognosia/UnB considera extratos ativos aqueles com $\text{CIM} \leq 125 \mu\text{g/mL}$ (ALBERNAZ *et al.*, 2010). Os extratos com valores de $\text{CIM} > 1000 \mu\text{g/mL}$ foram considerados inativos.

Os resultados da tabela demonstram um espectro amplo de atividade dos extratos em *C. albicans* e em espécies de *Candida* não-*albicans*: *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Segundo o CLSI (2008a), *C. glabrata* é resistente ao itraconazol, exibindo $\text{CIM} \geq 1 \mu\text{g/mL}$. A espécie também é intrinsecamente resistente ao fluconazol (ARENDRUP, 2014).

Tabela 3 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) dos extratos brutos de *Astronium fraxinifolium* em leveduras e dermatófitos.

Órgão ^a (Solvente) ^b	LEVEDURAS				DERMATÓFITOS			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (CIM µg/mL)	<i>Candida albicans</i> LMGO 102 (CIM µg/mL)	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 (CIM µg/mL)	<i>Candida glabrata</i> LMGO 44 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> LMGO 09 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28189 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i> LMGO 08 (CIM µg/mL)
CC (H)	62,50	250	62,50	> 1000	NT	> 1000	> 1000	> 1000
CC (AE)	0,48	0,48	3,90	250	125	250	250	125
CC (E)	0,48	0,24	0,48	125	125	31,25	250	31,25
CR (H)	> 1000	NT	> 1000	NT	NT	NT	> 1000	NT
CR (AE)	0,48	0,24	0,24	125	62,50	125	125	31,25
CR (E)	0,24	0,24	0,24	125	250	15,62	125	125
MC (H)	> 1000	NT	> 1000	NT	NT	NT	> 1000	NT
MC (Aq)	1,95	31,25	7,81	500	250	250	250	125
MR (H)	62,50	125	31,25	> 1000	NT	> 1000	> 1000	> 1000
MR (AE)	250	> 1000	> 1000	250	250	NT	250	NT
MR (E)	0,48	125	0,24	250	125	31,25	250	62,50
F (H)	> 1000	NT	> 1000	NT	NT	NT	> 1000	NT

Órgão ^a (Solvente) ^b	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (CIM µg/mL)	<i>Candida albicans</i> LMGO 102 (CIM µg/mL)	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 (CIM µg/mL)	<i>Candida glabrata</i> LMGO 44 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> LMGO 09 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28189 (CIM µg/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i> LMGO 08 (CIM µg/mL)
F (AE)	> 1000	> 1000	500	> 1000	> 1000	NT	> 1000	NT
Controles positivos								
Itraconazol	0,125	> 16	0,125	1	0,25	1	1	1
Fluconazol	2	> 64	2	8	NT	NT	NT	NT
Controles negativos								
RPMI 100%	-	-	-	-	-	-	-	-

Órgão vegetal^a - CC: Casca do caule; CR: Casca da raiz; MC: Madeira do caule; MR: Madeira da raiz; F: Folha

Solvente^b - H: Hexano; AE: Acetato de etila; E: Etanol; Aq: Aquoso

- : Inativo; NT: Não Testado

ATCC: *American Type Culture Collection* LMGO: Laboratório de Micologia de Goiás

Os treze extratos testados em 4 leveduras, equivalentes a 52 testes em duplicata, resultaram em 26 testes (50%) com CIM entre 0,24 e 125 $\mu\text{g/mL}$, sendo 7 testes ativos a 0,24 $\mu\text{g/mL}$ e 6 ativos a 0,48 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, a metade dos 26 testes demonstrou atividade próxima ou bem superior aos controles positivos itraconazol (CIM entre 0,125 e >16 $\mu\text{g/mL}$) e fluconazol (CIM entre 2 e >64 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 29). Os treze extratos testados em 4 dermatófitos, equivalentes a 52 testes em duplicata, resultaram em 16 testes com CIM entre 15,62 e 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30).

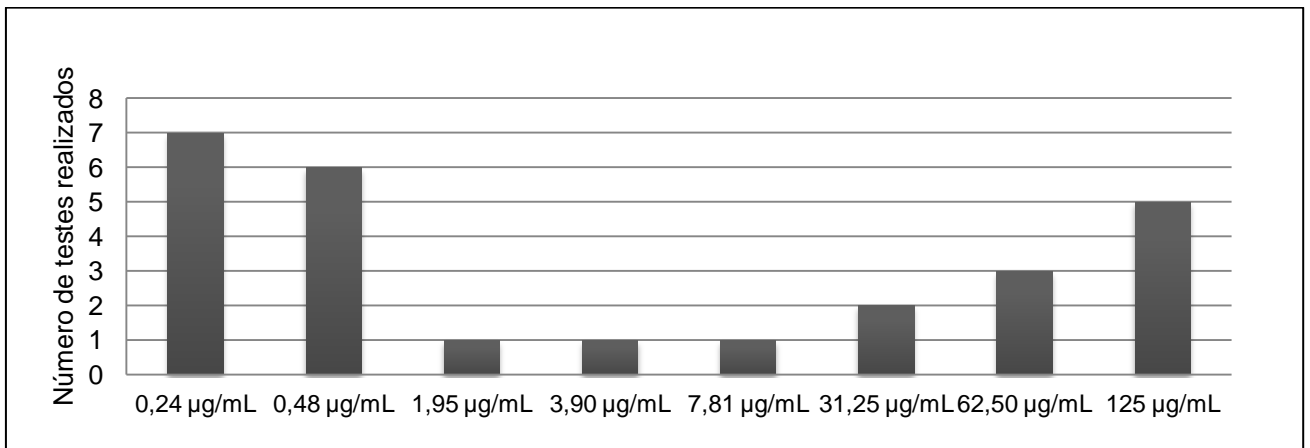


Figura 29 – Resultados obtidos com 52 testes em duplicata realizados para os 13 extratos em 4 leveduras – 26 testes apresentaram CIM entre 0,24 e 125 $\mu\text{g/mL}$.

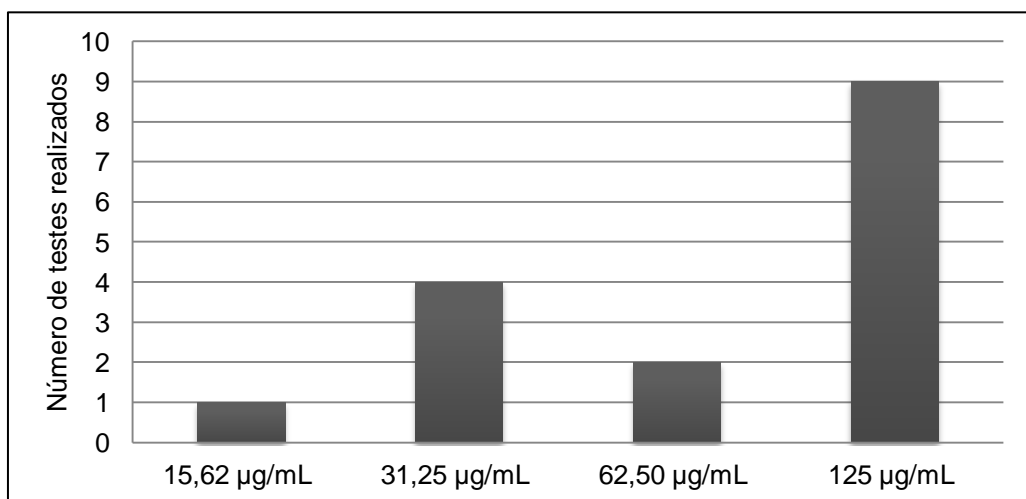


Figura 30 – Resultados obtidos com 52 testes em duplicata realizados para os 13 extratos em 4 dermatófitos – 16 testes apresentaram CIM entre 15,62 e 125 $\mu\text{g/mL}$.

Dos treze extratos avaliados, oito (62%) apresentaram CIM \leq 125 $\mu\text{g/mL}$ em pelo menos uma das leveduras testadas. Observaram-se melhores resultados de CIM para as leveduras (Tabela 3).

Como pode ser observado na tabela 3, os melhores valores de CIM foram de extratos produzidos a partir das cascas e das madeiras do caule e da raiz de *A. fraxinifolium*. Destacam-se os extratos acetato de etila da casca da raiz e etanólicos da casca do caule e da casca da raiz que apresentaram amplo espectro de atividade em todas as leveduras testadas, com valores de CIM de 0,24 a 125 $\mu\text{g/mL}$. O grupo do Laboratório de Farmacognosia da UnB, em seus quinze anos de pesquisa da atividade de espécies vegetais do Cerrado em fungos e protozoários, tem notado muitas vezes maiores atividades em extratos do caule e da raiz, principalmente da casca (DA COSTA *et al.*, 2014). Esses órgãos, em resposta ao ataque de fitopatógenos, insetos ou herbívoros, estimulam a produção de substâncias de defesa. O grupo tem observado também que a maioria dos extratos ativos em fungos é de média (acetato de etila) e/ou alta (etanólico, aquoso) polaridades, como pode ser constatado na tabela 3 (DA COSTA *et al.*, 2014).

Um total de cinco extratos demonstrou maior atividade que o controle positivo fluconazol em *C. albicans* ATCC 10231. Nesta cepa, apenas um extrato – aquoso da madeira do caule (CIM 1,95 $\mu\text{g/mL}$) – foi tão ativo quanto o fluconazol (CIM 2 $\mu\text{g/mL}$). Os extratos acetato de etila (CIM 0,48 $\mu\text{g/mL}$) e etanólico (CIM 0,48 $\mu\text{g/mL}$) da casca do caule, acetato de etila (CIM 0,48 $\mu\text{g/mL}$) e etanólico (CIM 0,24 $\mu\text{g/mL}$) da casca da raiz e etanólico da madeira da raiz (CIM 0,48 $\mu\text{g/mL}$) foram mais ativos que o fluconazol (CIM 2 $\mu\text{g/mL}$). O mesmo foi observado em *C. parapsilosis* ATCC 22019 com os extratos etanólico da casca do caule (CIM 0,48 $\mu\text{g/mL}$), acetato de etila (CIM 0,24 $\mu\text{g/mL}$) e etanólico (CIM 0,24 $\mu\text{g/mL}$) da casca da raiz e etanólico da madeira da raiz (CIM 0,24 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 3). A existência de melhores resultados de CIM em comparação ao controle positivo é um excelente indicativo de extrato promissor ao fracionamento cromatográfico. O extrato é um fitocomplexo constituído de diversas substâncias ativas e inativas, enquanto que o controle é uma substância pura ativa. Dessa forma, é possível que substâncias isoladas do extrato tenham melhores valores de CIM do que o próprio extrato.

Um total de quatro extratos – acetato de etila da casca do caule e da casca da raiz e etanólico da casca do caule e da casca da raiz – exibiram forte atividade (CIM de 0,24 e 0,48 $\mu\text{g/mL}$) em *C. albicans* LMGO 102, isolado clínico cujo perfil de

sensibilidade é resistente ao fluconazol (CIM > 64 µg/mL) e ao itraconazol (CIM > 16 µg/mL). Além de apresentarem atividade significativa em cepas susceptíveis – *C. albicans* ATCC 10231 (CIM de 0,24 e 0,48 µg/mL) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CIM de 0,24 a 3,90 µg/mL) –, tais extratos, com exceção do acetato de etila da casca do caule (CIM 250 µg/mL), também foram ativos em *C. glabrata* LMGO 44 (CIM 125 µg/mL) (Tabela 3).

Em relação aos dermatófitos, do total de extratos avaliados, seis (46%) apresentaram CIM ≤ 125 µg/mL em pelo menos um dos dermatófitos testados. O extrato acetato de etila da casca da raiz (CIM 62,5 µg/mL) foi o mais ativo em *T. mentagrophytes* ATCC 9533; o extrato etanólico da casca da raiz (CIM 15,62 µg/mL) foi o mais ativo em *T. mentagrophytes* LMGO 09; os extratos acetato de etila e etanólico da casca da raiz (CIM 125 µg/mL) foram os únicos ativos em *T. rubrum* ATCC 28189; e os extratos etanólico da casca do caule e acetato de etila da casca da raiz (CIM 31,25 µg/mL) foram os mais ativos em *T. rubrum* LMGO 08 (Tabela 3).

Os extratos hexânicos da casca da raiz, folhas e madeira do caule não apresentaram atividade em leveduras e dermatófitos (Tabela 3).

Dentre os treze extratos avaliados, o acetato de etila da casca da raiz exibiu amplo espectro de ação em todos os fungos avaliados com CIM de 0,24 a 125 µg/mL. Esse extrato foi escolhido para o fracionamento químico devido à sua atividade antifúngica significativa, à média polaridade, à boa quantidade de extrato disponível no banco e ao perfil químico. O segundo extrato selecionado para fracionamento foi o acetato de etila das folhas devido ao seu perfil químico, à média polaridade, à boa quantidade de extrato disponível no banco e ao interesse no aspecto quimiotaxonômico da família Anacardiaceae, em especial a espécie *A. fraxinifolium* cuja fitoquímica ainda é pouco conhecida.

Considerando o aumento da incidência das candidíases – com destaque para aquelas causadas por *C. albicans* e espécies não-*albicans* resistentes à terapia medicamentosa, e das dermatofitoses – estima-se que 10 a 15% da população será infectada por um dermatófito em algum momento de suas vidas (PFALLER *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2014), os valores de CIM encontrados em *A. fraxinifolium* são promissores para a pesquisa de novos antifúngicos.

4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAIZ DE *A. fraxinifolium*

A realização da CCD do extrato acetato de etila da casca da raiz permitiu observar uma forte pigmentação vermelha/alaranjada no ponto de aplicação do extrato na placa de sílica após revelação com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, indicando possível presença de taninos (Figura 31) (SHARMA *et al.*, 1998; MUELLER-HARVEY, 2001).

80 CICLOHEXANO : 20 ACETATO DE ETILA

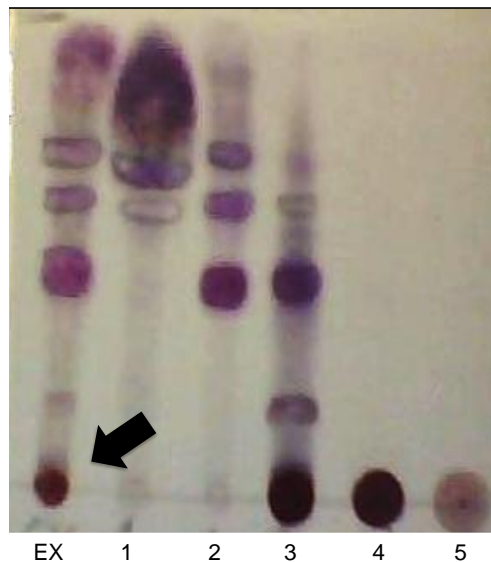


Figura 31 – Placa de CCD com seta indicando o ponto de aplicação do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium* com pigmentação vermelha após revelação com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento. (1): fração hexânica (2): fração diclorometânica; (3): fração acetato de etila; (4): fração etanólica; (5): fração metanólica.

O extrato (23 g) foi fracionado em coluna de Sephadex LH 20, utilizando metanol como fase móvel. Essa coluna foi escolhida de início, pois sabe-se que o gel de dextran hidroxipropilado adsorve fortemente vários tipos de taninos, facilitando a eluição dos outros metabólitos secundários presentes no extrato (OKUDA *et al.*, 1989; SANTOS & DE MELLO, 2007). Quando se utiliza como eluente

o metanol em coluna de Sephadex LH 20, os taninos são eluídos em ordem crescente de polaridade e tamanho (SANTOS & DE MELLO, 2007). Dessa forma, seria possível separar os taninos, substâncias não desejáveis para isolamento naquele momento, dos outros metabólitos de interesse. Segue o fluxograma do fracionamento do extrato (Figura 32).

Sete frações foram obtidas, sendo que o perfil em CCD das frações F4 a F7 ainda mostrava a pigmentação vermelha nos pontos de aplicação na placa após revelação com vanilina sulfúrica (Figura 33). Mesmo com o emprego do gel de dextran hidroxipropilado, taninos foram eluídos.

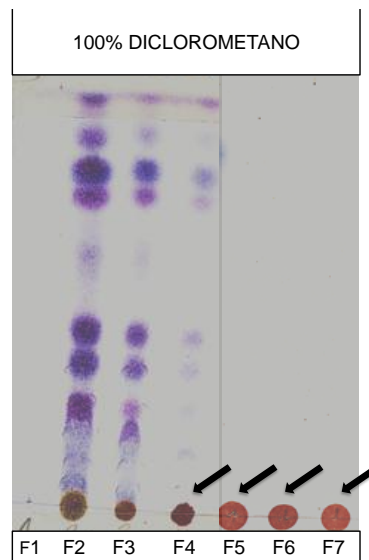


Figura 33 – Placa de CCD com as frações obtidas em coluna de Sephadex LH 20. As setas indicam o ponto de aplicação de F4 a F7 com pigmentação vermelha após revelação com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

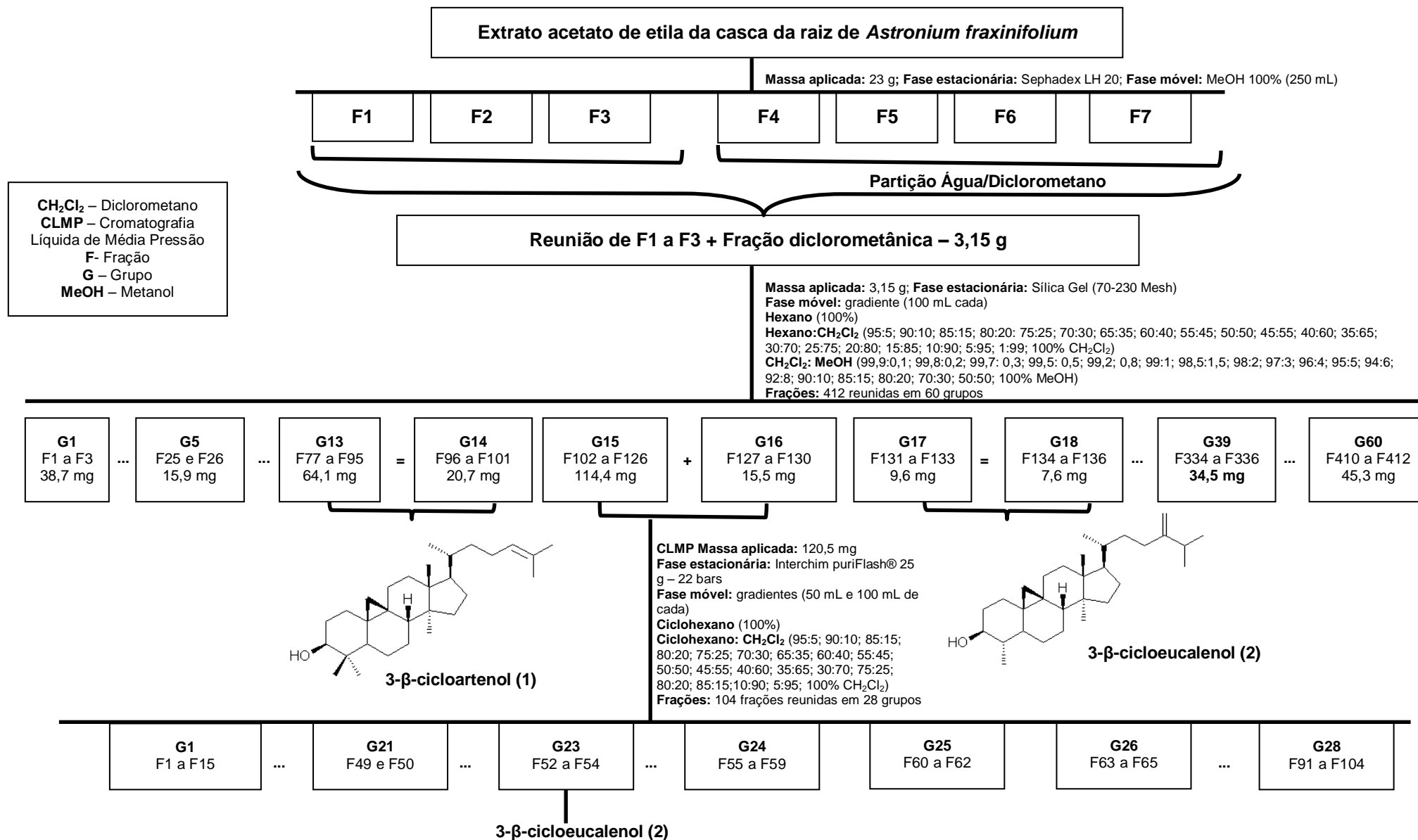


Figura 32 – Fluxograma de purificação do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium*.

Para prosseguir com a separação dos taninos dos demais metabólitos, foi realizada uma partição água/diclorometano das frações F4 a F7 reunidas. Adicionaram-se volumes iguais de água e diclorometano ao funil de separação, seguido de agitação e formação do sistema bifásico. O processo foi repetido por três vezes. Os taninos, compostos muito polares, se solubilizaram na água, enquanto as outras substâncias se solubilizaram no diclorometano (Figura 34). Recuperou-se a fração diclorometânica, que foi concentrada em evaporador rotatório.

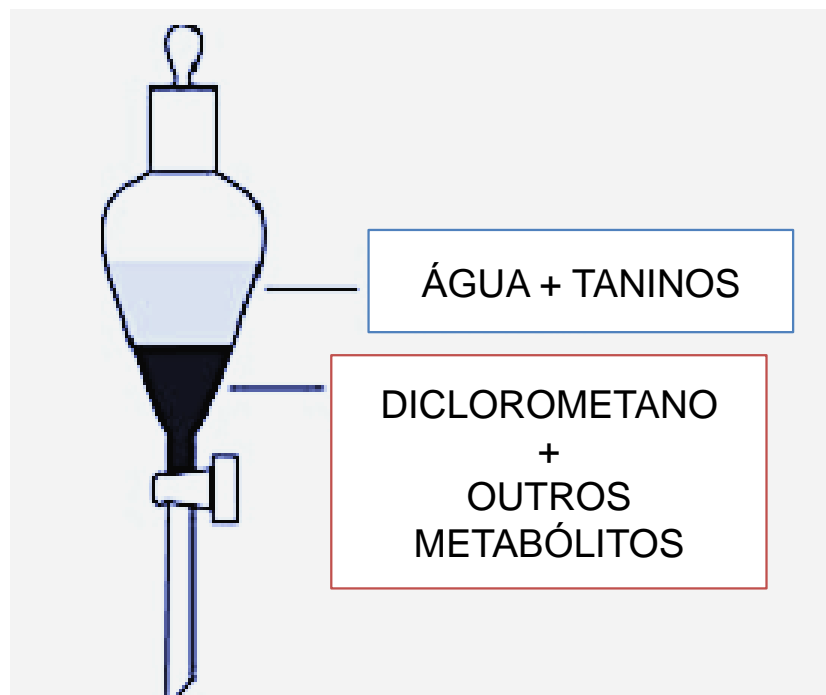


Figura 34 – Esquema da partição água/diclorometano das frações F4 a F7 reunidas, provenientes do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium* em coluna de Sephadex LH 20.

As frações F1 a F3 foram reunidas com a fração diclorometânica, resultando em uma amostra de massa 3,15 g. Esta foi fracionada em coluna aberta de sílica (Figura 35). O rendimento aproximado da coluna foi de 82,32%. Foram obtidas 412 frações reunidas em 60 grupos, segundo o perfil em CCD (Tabela 4).



Figura 35 – Fracionamento em coluna aberta de sílica da amostra de 3,15 g, proveniente do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium*.

Tabela 4 – Fracionamento em coluna aberta de sílica da amostra de 3,15 g, proveniente do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium*.

GRUPO	FRAÇÕES	ELUENTE	MASSA (mg)
1	1 a 3	Hexano 100%	38,7
2	4 e 5	Hexano 100%	102,9
3	8 a 10	Hexano/Diclorometano (95:5)	95,6
4	11 a 23	Hexano/Diclorometano (90:10)	107,3
5	25 e 26	Hexano/Diclorometano (90:10)	15,9
6	27 e 28	Hexano/Diclorometano (90:10)	20,2
7	29 a 41	Hexano/Diclorometano (85:15)	86,8
8	42 a 49	Hexano/Diclorometano (80:20)	11,2
9	50 a 55	Hexano/Diclorometano (75:25)	6,3
10	56 a 71	Hexano/Diclorometano (70:30)	11,0
11	72 a 74	Hexano/Diclorometano (65:35)	1,4
12	75 e 76	Hexano/Diclorometano (65:35)	1,9
13	77 a 95	Hexano/Diclorometano (60:40)	64,1
14	96 a 101	Hexano/Diclorometano (55:45)	20,7
15	102 a 126	Hexano/Diclorometano (50:50) até Hexano/Diclorometano (40:60)	114,4
16	127 a 130	Hexano/Diclorometano (35:65)	15,5
17	131 a 133	Hexano/Diclorometano (35:65)	9,6
18	134 a 136	Hexano/Diclorometano (35:65)	7,6
19	137 a 144	Hexano/Diclorometano (30:70)	13,1
20	145 a 148	Hexano/Diclorometano (30:70)	8,0
21	149 a 153	Hexano/Diclorometano (25:75)	15,0

GRUPO	FRAÇÕES	ELUENTE	MASSA (mg)
22	154 a 159	Hexano/Diclorometano (25:75)	28,6
23	160 a 162	Hexano/Diclorometano (20:80)	11,9
24	163 a 166	Hexano/Diclorometano (20:80)	11,7
25	167 a 176	Hexano/Diclorometano (15:85)	36,5
26	177 a 190	Hexano/Diclorometano (10:90)	85,7
27	191 a 196	Hexano/Diclorometano (5:95)	31,3
28	197 a 210	Hexano/Diclorometano (1:99)	54,3
29	211 a 245	Diclorometano 100% até Diclorometano/Metanol (99,8:0,2)	57,4
30	246 a 254	Diclorometano/Metanol (99,7:0,3)	7,5
31	255 a 265	Diclorometano/Metanol (99,5:0,5)	7,3
32	266 a 276	Diclorometano/Metanol (99,2:0,8)	6,3
33	277 a 286	Diclorometano/Metanol (99:1)	5,2
34	287 a 296	Diclorometano/Metanol (98,5:1,5)	4,7
35	297 a 306	Diclorometano/Metanol (98:2)	4,2
36	307 a 318	Diclorometano/Metanol (97:3)	3,5
37	319 a 327	Diclorometano/Metanol (96:4)	302,7
38	328 a 333	Diclorometano/Metanol (95:5)	57,2
39	334 a 336	Diclorometano/Metanol (94:6)	34,5
40	337 a 338	Diclorometano/Metanol (94:6)	14,2
41	339 a 344	Diclorometano/Metanol (94:6)	23,2
42	345 a 349	Diclorometano/Metanol (92:8)	22,7
43	350 a 355	Diclorometano/Metanol (92:8)	27,1
44	356 a 357	Diclorometano/Metanol (90:10)	11,1
45	358 a 360	Diclorometano/Metanol (90:10)	16,8
46	361 a 364	Diclorometano/Metanol (90:10)	17,2
47	365 a 366	Diclorometano/Metanol (85:15)	15,5
48	367 a 371	Diclorometano/Metanol (85:15)	55,6
49	372 a 373	Diclorometano/Metanol (85:15)	12,9
50	374 a 375	Diclorometano/Metanol (85:15)	24,4
51	376 a 378	Diclorometano/Metanol (80:20)	55,6
52	379 a 381	Diclorometano/Metanol (80:20)	63,9
53	382 a 383	Diclorometano/Metanol (80:20)	42,7
54	384 a 386	Diclorometano/Metanol (70:30)	72,8
55	387 a 392	Diclorometano/Metanol (70:30)	98,8
56	393 a 395	Diclorometano/Metanol (50:50)	58,1
57	396 a 403	Diclorometano/Metanol (50:50)	216,2
58	404 a 406	Metanol 100%	98,7
59	407 a 409	Metanol 100%	82,7
60	410 a 412	Metanol 100%	45,3

A partir dos grupos G13 (64,1 mg) e G14 (20,7 mg) (Figura 36), foi obtido o triterpeno do tipo cicloartano 3- β -cicloartenol (**1**) (NES *et al.*, 1998), juntamente com outro produto minoritário. Dos grupos G17 (9,6 mg) e G18 (7,6 mg) (Figura 36), foi obtido um outro cicloartano, 3- β -cicloeucaalenol (**2**) (KIKUCHI *et al.*, 1986), juntamente com outro produto minoritário. Para a elucidação estrutural dos triterpenos foram analisados espectros de RMN ^1H , COSY, HSQC e HMBC.

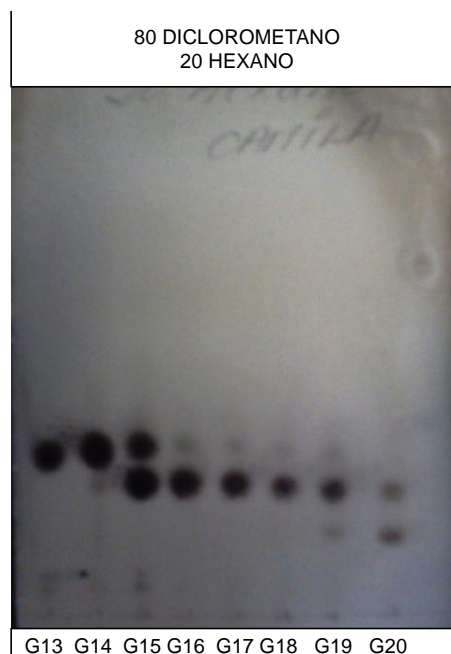


Figura 36 – Placa de CCD com o perfil dos grupos G13 a G20 obtidos do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium*.

Os grupos G15 e G16 (Figura 36) foram reunidos devido à semelhança do perfil em CCD. A reunião resultou em uma amostra de 120,5 mg que foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (CLMP), utilizando gradientes de ciclohexano e diclorometano como fase móvel. Ao final, foram obtidas 104 frações reunidas em 28 grupos. A partir do grupo G23 foi obtido novamente o 3- β -cicloeucaleanol (Figura 32 do fluxograma). Para a elucidação estrutural foram analisados espectros de RMN ^1H , COSY, HSQC e HMBC.

4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *A. fraxinifolium*

Uma quantidade de 15,5 g de extrato acetato de etila das folhas foi fracionada em coluna aberta de sílica, utilizando como fase móvel gradientes de ciclohexano, diclorometano e metanol (Figura 37). As 166 frações obtidas foram reunidas em 18 grupos segundo o perfil em CCD (Tabela 5). Os grupos G5 a G7 foram reunidos

(1390,6 mg) e fracionados em coluna aberta de sílica com gradientes de ciclohexano, clorofórmio e metanol, resultando em 746 frações reunidas em 90 grupos. O grupo G51 foi submetido à CG/EM, sendo identificada a tremulona (**3**) (Figura 37).

Os grupos G10 e G11, obtidos do primeiro fracionamento do extrato, foram reunidos (1333,7 mg) e fracionados em coluna aberta de sílica com gradientes de ciclohexano e acetato de etila, resultando em 143 frações reunidas em 7 grupos (Figura 37 e Tabela 6). Destes, o grupo G5 (461,1 mg) foi fracionado em coluna aberta de sílica com gradientes de ciclohexano e acetato de etila, resultando em 67 frações reunidas em 11 grupos (Figura 37 e Tabela 7). O grupo G6 (44,4 mg) (Figura 38) foi submetido à CG/EM, sendo identificados a β -amirina (**4**) e o lupeol (**5**) (Figura 37).

Tabela 5 – Fracionamento em coluna aberta de sílica do extrato acetato de etila das folhas (15,5 g) de *Astronium fraxinifolium*.

GRUPO	FRAÇÕES	ELUENTE	MASSA (mg)
1	1 a 3	Ciclohexano 100%	56,6
2	4 a 7	Ciclohexano /Diclorometano (98:2)	17,1
3	8 a 11	Ciclohexano /Diclorometano (95:5)	54,5
4	12 a 15	Ciclohexano /Diclorometano (90:10)	34,7
5	16 a 22	Ciclohexano /Diclorometano (85:15)	47,9
6	23 a 32	Ciclohexano /Diclorometano (80:20) até Ciclohexano /Diclorometano (70:30)	61,1
7	33 a 40	Ciclohexano /Diclorometano (65:35) Ciclohexano /Diclorometano (60:40)	30,0
8	41 a 43	Ciclohexano /Diclorometano (55:45)	49,9
9	44 a 50	Ciclohexano /Diclorometano (50:50) Ciclohexano /Diclorometano (45:55)	129,2
10	51 a 63	Ciclohexano /Diclorometano (40:60) Ciclohexano /Diclorometano (35:65)	624,5
11	64 a 76	Ciclohexano /Diclorometano (30:70) até Ciclohexano /Diclorometano (15:85)	709,2
12	77 a 104	Ciclohexano /Diclorometano (10:90) até Diclorometano/Metanol (99,7:0,3)	1147,6
13	105 a 133	Diclorometano/Metanol (99,5:0,5) até Diclorometano/Metanol (96:4)	574,9
14	134 a 137	Diclorometano/Metanol (95:5) Diclorometano/Metanol (94:6)	1604,2
15	138 a 148	Diclorometano/Metanol (92:8) Diclorometano/Metanol (90:10)	1705,0
16	149 a 151	Diclorometano/Metanol (85:15)	463,4
17	152 a 161	Diclorometano/Metanol (80:20) Diclorometano/Metanol (70:30)	1035,9
18	162 a 166	Diclorometano/Metanol (50:50) Methanol 100%	1724,2

Extrato acetato de etila das folhas de *Astronium fraxinifolium*

CH₂Cl₂ - Diclorometano
F - Fração
G – Grupo
MeOH – Metanol

Massa aplicada: 15,5 g
Fase estacionária: Sílica Gel (70-230 Mesh)
Fase móvel: gradiente (500 mL cada)
Ciclohexano (100%)
Ciclohexano:CH₂Cl₂ (98:2; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 55:45; 50:50; 45:55; 40:60; 35:65; 30:70; 25:75; 20:80; 15:85; 10:90; 5:95; 1:99; 100% CH₂Cl₂)
CH₂Cl₂: MeOH (99,9:0,1; 99,8:0,2; 99,7: 0,3; 99,5: 0,5; 99,2: 0,8; 99,1; 98,5:1,5; 98:2; 97:3; 96:4; 95:5; 94:6; 92:8; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30; 50:50; 100% MeOH)
Frações: 166 reunidas em 18 grupos

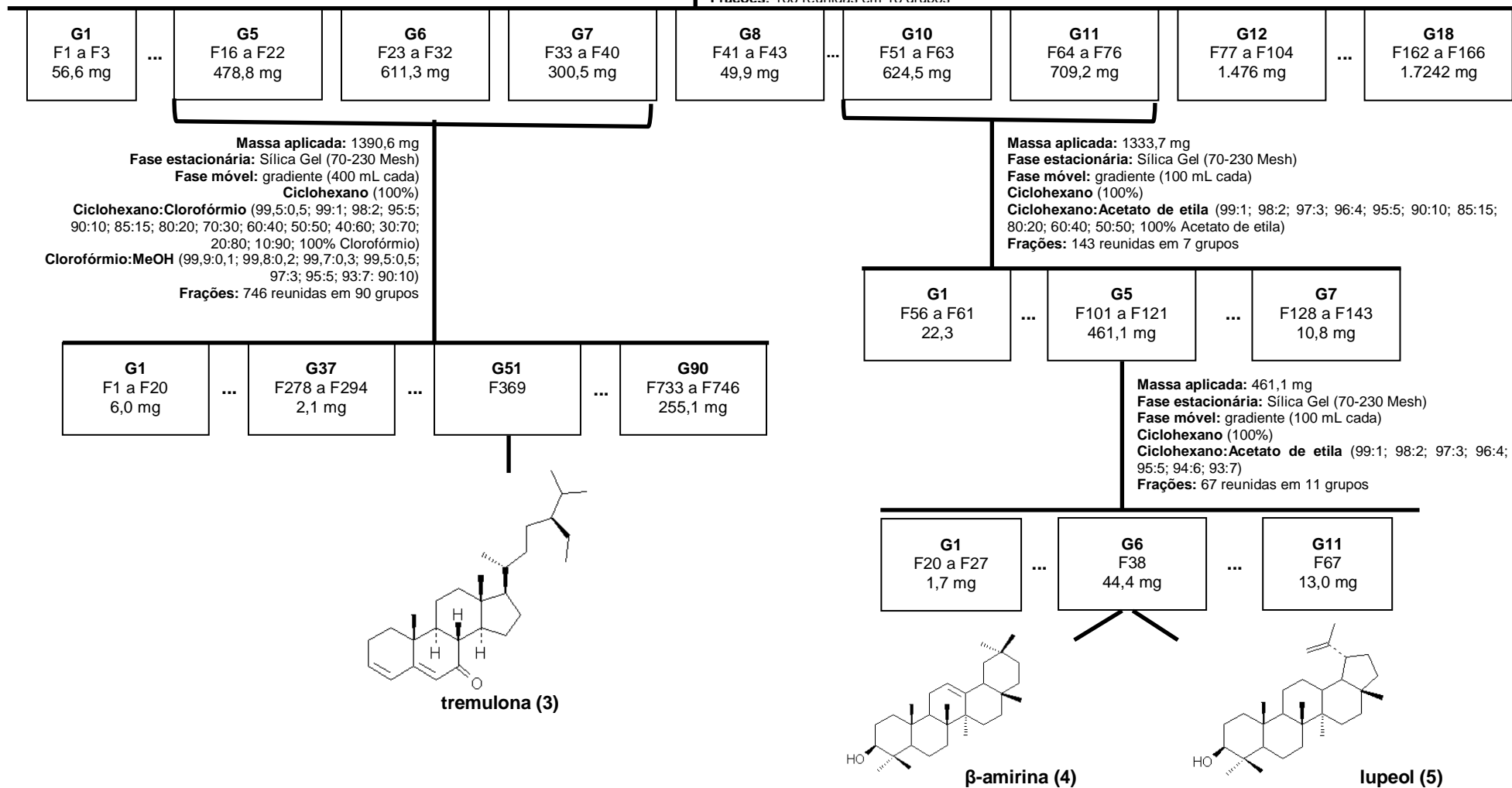


Figura 37 – Fluxograma de purificação do extrato acetato de etila das folhas de *Astronium fraxinifolium*.

Tabela 6 – Fracionamento em coluna aberta de sílica da reunião de G10 e G11 (1333,7 mg), provenientes do extrato acetato de etila das folhas de *Astronium fraxinifolium*.

GRUPO	FRAÇÕES	ELUENTE	MASSA (mg)
1	56 a 61	Ciclohexano/Acetato de etila (97:3)	22,3
2	62 a 74	Ciclohexano/Acetato de etila (96:4)	81,0
3	75 a 91	Ciclohexano/Acetato de etila (95:5)	216,4
4	92 a 100	Ciclohexano/Acetato de etila (90:10)	252,1
5	101 a 121	Ciclohexano/Acetato de etila (85:15)	461,1
		Ciclohexano/Acetato de etila (80:20)	
		Ciclohexano/Acetato de etila (60:40)	
6	122 a 127	Ciclohexano/Acetato de etila (50:50)	13,7
7	128 a 143	Acetato de etila 100%	10,8

Tabela 7 – Fracionamento em coluna aberta de sílica do grupo G5 (461,1 mg), proveniente da reunião de G10 e G11 do extrato acetato de etila das folhas de *Astronium fraxinifolium*.

GRUPO	FRAÇÕES	ELUENTE	MASSA (mg)
1	20 a 27	Ciclohexano/Acetato de etila (98:2)	1,7
2	28 a 33	Ciclohexano/Acetato de etila (97:3)	0,3
3	34 a 35	Ciclohexano/Acetato de etila (96:4)	4,5
4	36	Ciclohexano/Acetato de etila (96:4)	9,0
5	37	Ciclohexano/Acetato de etila (96:4)	18,6
6	38	Ciclohexano/Acetato de etila (96:4)	44,4
7	39 a 48	Ciclohexano/Acetato de etila (95:5)	300,5
8	49	Ciclohexano/Acetato de etila (95:5)	4,1
9	50 a 54	Ciclohexano/Acetato de etila (94:6)	8,9
10	55 a 66	Ciclohexano/Acetato de etila (93:7)	18,0
11	67	Ciclohexano/Acetato de etila (93:7)	13,0

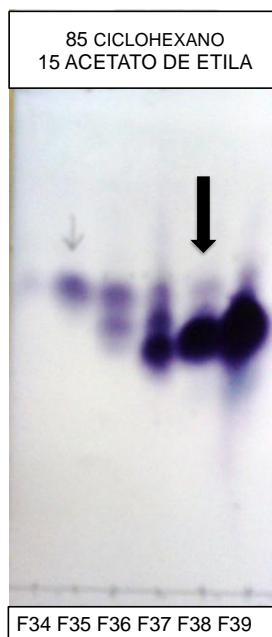


Figura 38 – Placa de CCD com as frações F34 a F39 obtidas do fracionamento da reunião de G10 e G11 do extrato acetato de etila das folhas de *Astronium fraxinifolium*. A fração F38 corresponde ao grupo G6 (44,4 mg) de onde foram identificados β -amirina (**4**) e lupeol (**5**).

4.4 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA CASCA DA RAIZ E DAS FOLHAS DE *A. fraxinifolium*

4.4.1 Triterpenos do tipo cicloartano

Os triterpenos do tipo cicloartano têm ampla distribuição no reino vegetal e são derivados do cicloartenol (BOAR & ROMER, 1975). O anel ciclopropano presente em suas estruturas químicas lhes confere espectros característicos de RMN e de massa (BOAR & ROMER, 1975). Em alguns protistas e em vegetais superiores, o triterpeno cicloartenol é formado a partir da ciclização de (3S)-2,3-óxidoesqualeno sob ação da cicloartenol sintase (Figura 39) (KOLESNIKOVA *et al.*, 2006). O cicloartenol é o primeiro precursor cíclico dos triterpenos tetracíclicos e fitoesteróis em plantas e algas (RÍOS *et al.*, 2000; RAHIER, 2011). Ele é importante na biossíntese de esteróis, como o sitosterol, assim como o lanosterol é fundamental para síntese de esteróis presentes nas membranas de células animais e fúngicas –

colesterol e ergosterol, respectivamente (BOAR & ROMER, 1975; MAHATO & SEN, 1997; KOLESNIKOVA *et al.*, 2006). Cicloeucaleanol também é um intermediário da biossíntese de esteróis em eucariotos fotossintéticos (RAHIER *et al.*, 1977). Ele deriva do cicloartenol, sendo produzido a partir do intermediário 24-metileno cicloartenol (Figura 39).

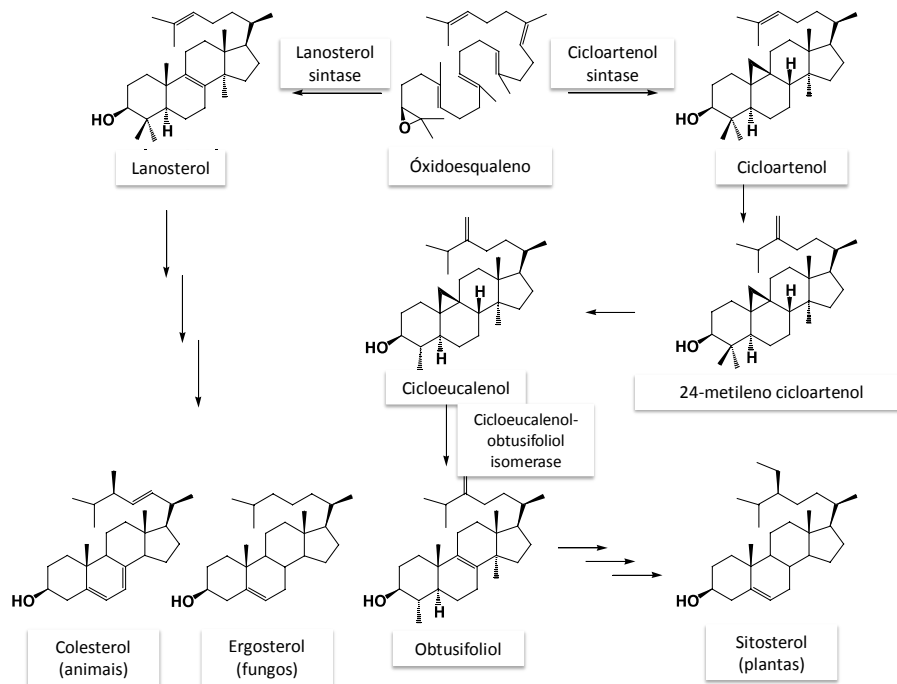


Figura 39 – Esquema da síntese de cicloartenol e cicloeucaleanol.

Fonte: KOLESNIKOVA *et al.*, 2006 (traduzido).

Diversos triterpenos do tipo cicloartano foram isolados de espécies da família Anacardiaceae, principalmente de *Mangifera indica* e *Rhus sylvestris*. Não há relatos na literatura do isolamento desses triterpenos em *A. fraxinifolium*. A partir da casca do caule de *M. indica* foram isolados os seguintes triterpenos do tipo cicloartano: cicloart-24-ano-3 β ,26-diol, C-24 epímeros de cicloart-25-ano-3 β ,24,27-triol, C-24 epímeros de cicloartano-3 β ,24,25-triol, cicloartenol, 3 β -hidroxícicloart-25-en-26-al, C-24 epímeros de cicloart-25-ano-3 β ,24-diol, 24-metilenocicloartano-3 β ,26-diol, cicloart-23-ano-3 β ,25-diol, ácido 29-hidroximangiferônico, ácido isomangiferólico, ácido mangiferólico e ácido ambólico (ANJANEYULU *et al.*, 1985; ANJANEYULU *et al.*, 1994; ESCOBEDO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012). Das raízes foram isolados

cicloartano-3 β ,30-diol e cicloartan-30-ol (KHAN *et al.*, 1994). A partir do extrato metanólico do caule e das folhas de *R. sylvestris* foram isolados três triterpenos: cicloart-24-an-3-ona, cicloart-25-ano-3,24-diona e 24-hidroxicicloart-25-an-3-ona (DING *et al.*, 2009).

4.4.1.1 Composto 3- β -cicloartenol

A partir dos grupos G13 e G14, provenientes do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz, foi obtido o 3- β -cicloartenol (Figura 40). Os grupos G13 e G14 foram analisados por RMN ^1H , HSQC, HMBC e COSY (Figuras 41 a 47) e massa (Figura 48), apresentando perfis semelhantes que possibilitaram a elucidação da estrutura molecular do triterpeno.

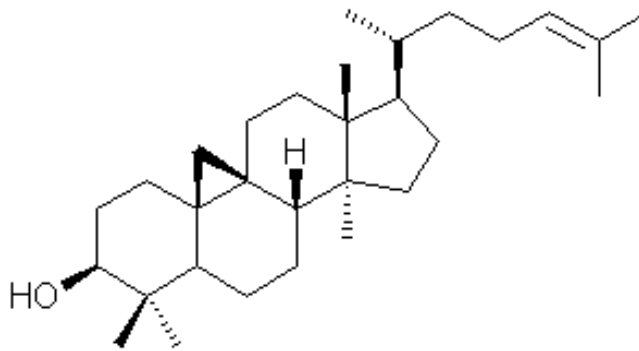


Figura 40 – Estrutura molecular do 3- β -cicloartenol isolado do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Astronium fraxinifolium*.

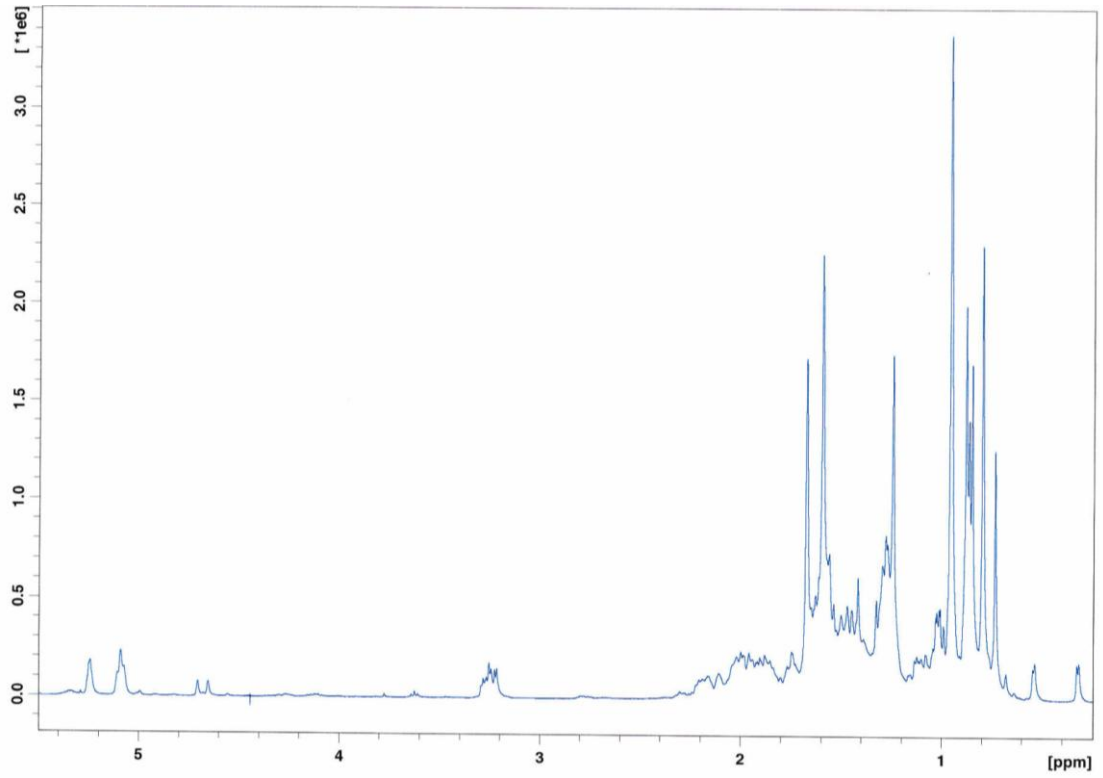


Figura 41 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G13.

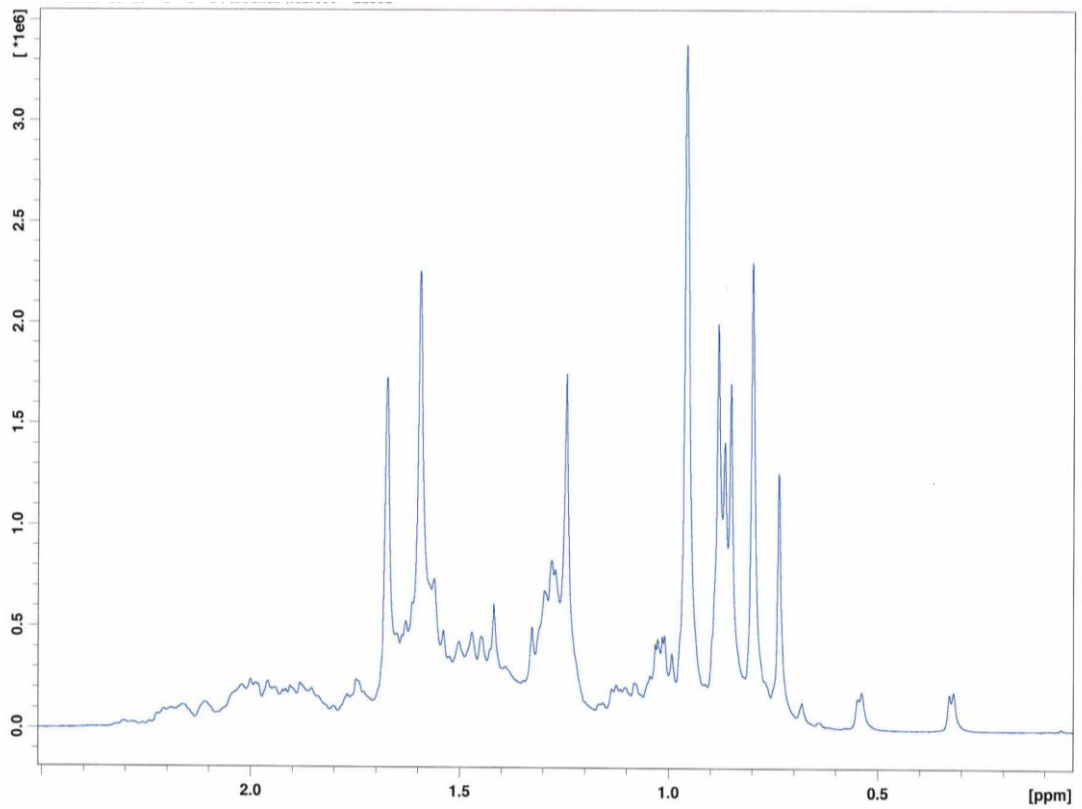


Figura 42 – Detalhe da expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G13.

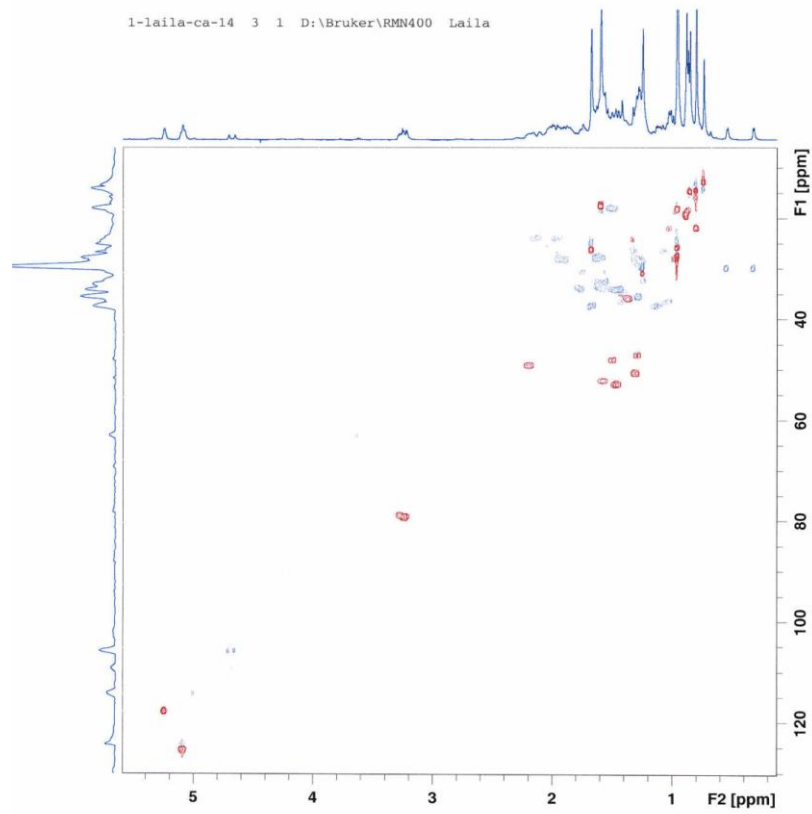


Figura 43 – Espectro HSQC do grupo G14.

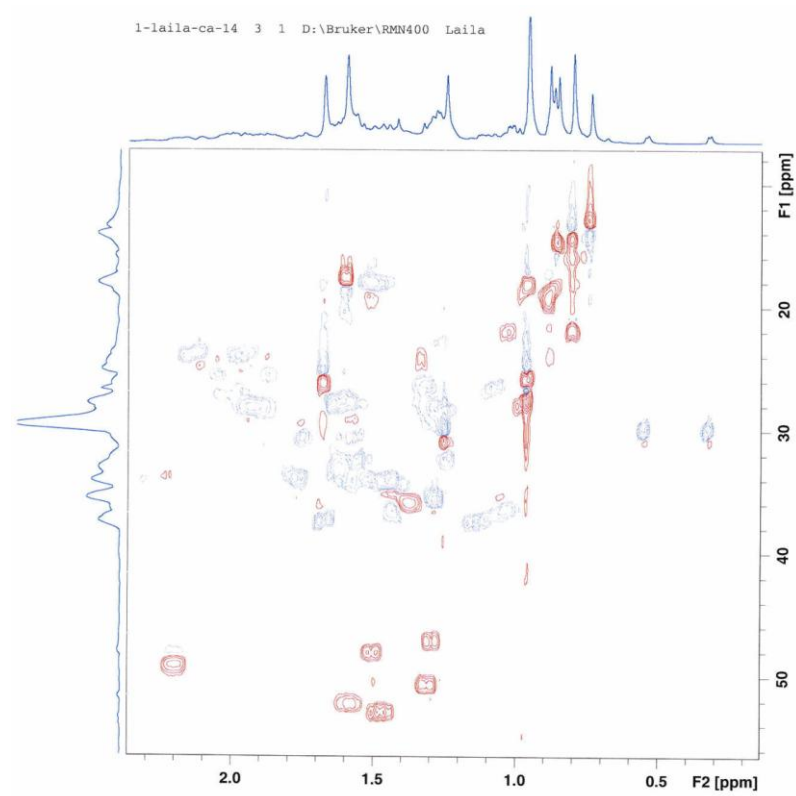


Figura 44 – Expansão do espectro HSQC do grupo G14.

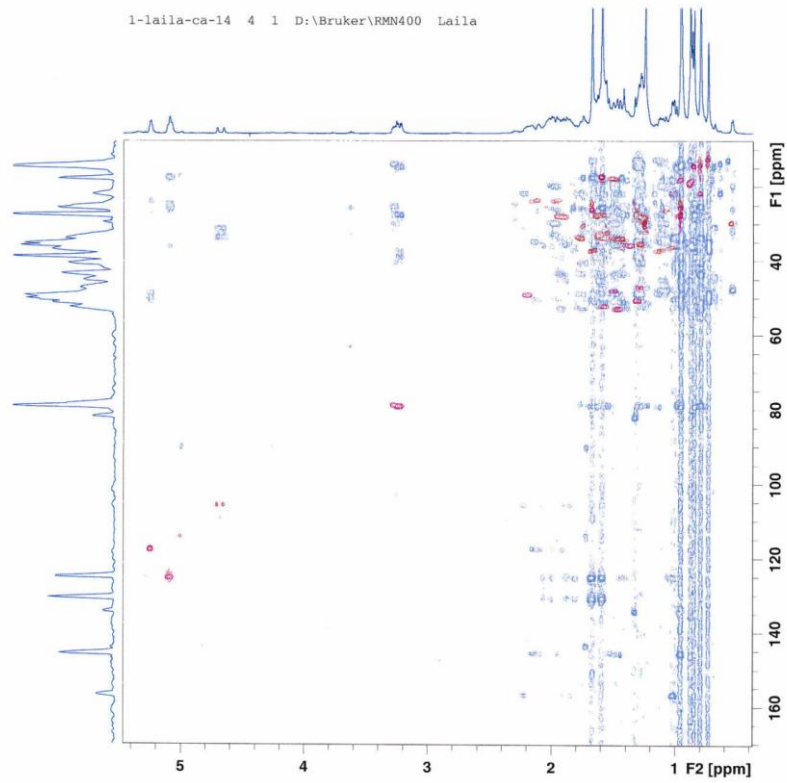


Figura 45 – Espectro HMBC do grupo G14.

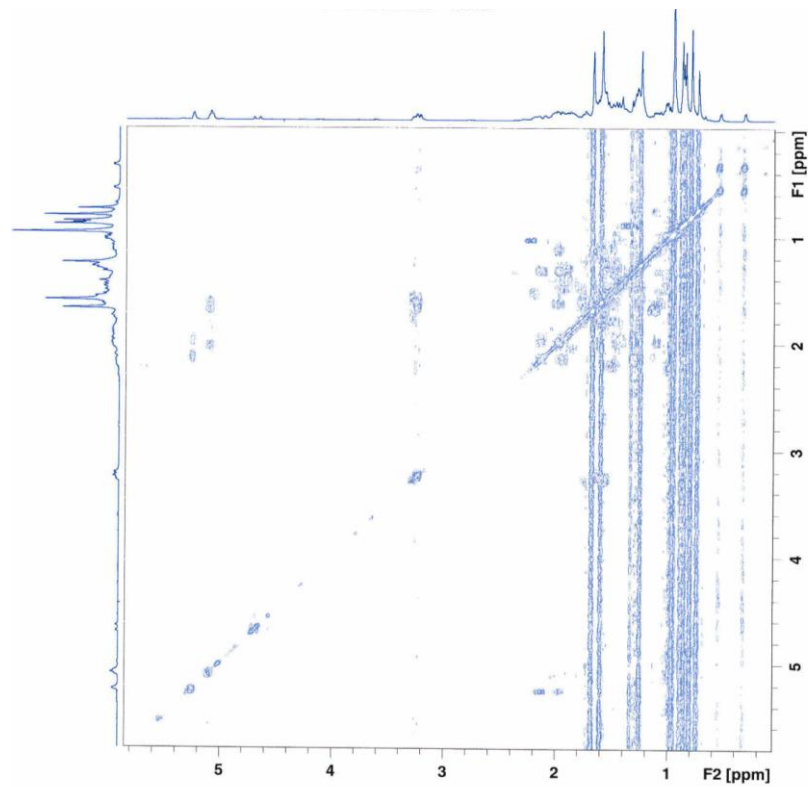


Figura 46 – Espectro COSY do grupo G14.

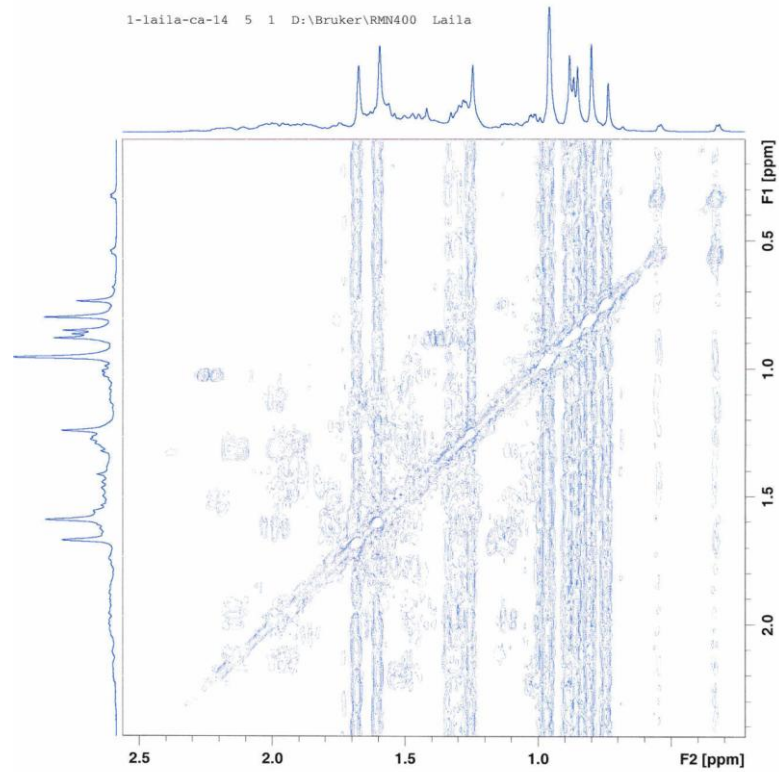


Figura 47 – Expansão do espectro COSY do grupo G14.

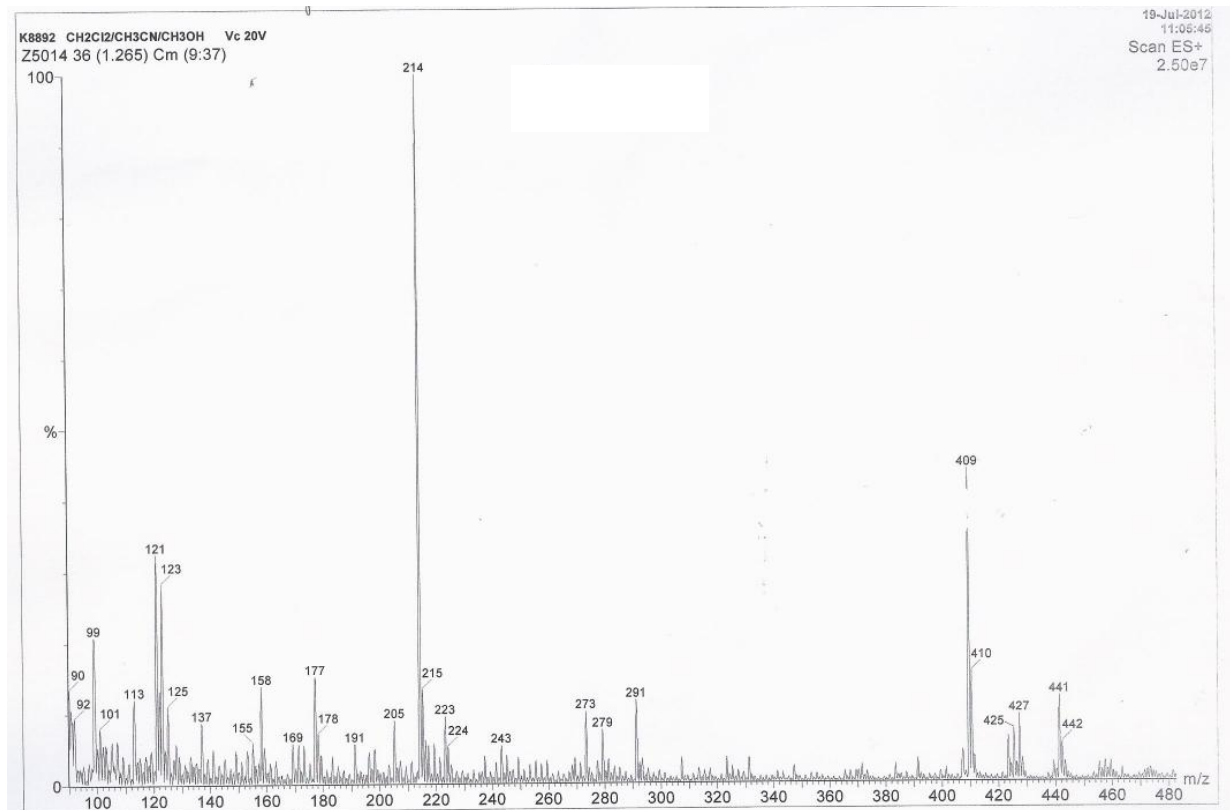


Figura 48 – Espectro de massa do grupo G14 em modo positivo $[M+H]^+$.

Os grupos G13 e G14 foram submetidos ao teste de microdiluição para determinação dos valores de CIM em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. A concentração da amostra no primeiro poço foi de 250 µg/mL. Não foi demonstrada atividade antifúngica.

Os grupos também foram avaliados quanto ao potencial antitumoral *in vitro* em quatro linhagens de células por meio do ensaio de citotoxicidade (Tabela 8). A amostra G14 apresentou atividade em células leucêmicas (HL-60) (CI₅₀ 10,8 µg/mL). Os dois grupos não exibiram atividade citotóxica nas linhagens HCT-116, OVCAR-8 e SF-295 (CI₅₀ > 25 µg/mL).

Tabela 8 – Valores de CI₅₀ (µg/mL) dos grupos G13 e G14 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL.

AMOSTRAS	HL-60	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
	(CI ₅₀ µg/mL)	(CI ₅₀ µg/mL)	(CI ₅₀ µg/mL)	(CI ₅₀ µg/mL)
G13	NT	> 25	> 25	> 25
G14	10,8 (8,3-14,0)	> 25	> 25	> 25
Doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09-0,17)	0,26 (0,17-0,3)	0,24 (0,2-0,27)

NT: não testado

Na literatura, são descritas atividades anti-inflamatória e antitumoral *in vivo* para o cicloartenol e seus ésteres. O cicloartenol, isolado de extrato metanólico de farelo de arroz, inibiu significativamente a inflamação induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) aplicado em orelhas de camundongos (YASUKAWA *et al.*, 1998; AKIHISA *et al.*, 2000). A taxa de inibição do edema na orelha dos camundongos foi de 92% considerando uma concentração de 0,5 mg/orelha de cicloartenol aplicado (AKIHISA *et al.*, 2000). Cicloartenol isolado de

flores da família Compositae (Asteraceae) também inibiu a inflamação induzida por TPA em camundongos (DI_{50} 0,3 mg/orelha) (AKIHISA *et al.*, 1996).

Além disso, o *trans*-ferulato de cicloartenol, isolado de extrato metanólico de farelo de arroz, inibiu a atividade promotora de tumor do TPA na carcinogênese de pele de camundongos iniciados com 7,12-dimetilbenzantraceno (YASUKAWA *et al.*, 1998). O ferulato de cicloartenol é produzido a partir da esterificação do grupo hidroxila do carbono C-3 do triterpeno com ácido ferúlico (YASUKAWA *et al.*, 1998). Na vigésima semana, o tratamento com 2 μ mol/camundongo de ferulato de cicloartenol reduziu em 86% o número médio de tumores por camundongo (DI_{50} 0,2 mg/orelha) (YASUKAWA *et al.*, 1998).

4.4.1.2 Composto 3- β -cicloeucaalenol

A partir dos grupos G17 e G18, provenientes do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz, foi obtido o 3- β -cicloeucaalenol (Figura 49). Os grupos G17 e G18 foram analisados por RMN 1H , HSQC, HMBC e COSY e massa, apresentando perfis semelhantes que possibilitaram a elucidação estrutural do triterpeno. 3- β -cicloeucaalenol também foi isolado do grupo G23, obtido do fracionamento da reunião de G15 e G16, provenientes do extrato acetato de etila da casca da raiz (Figuras 50 a 57).

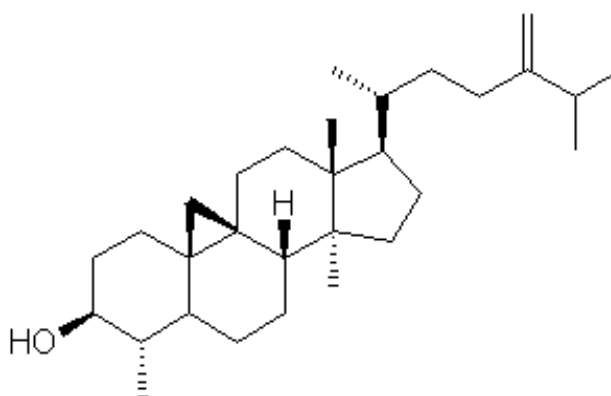


Figura 49 – Estrutura molecular do 3- β -cicloeucaalenol.

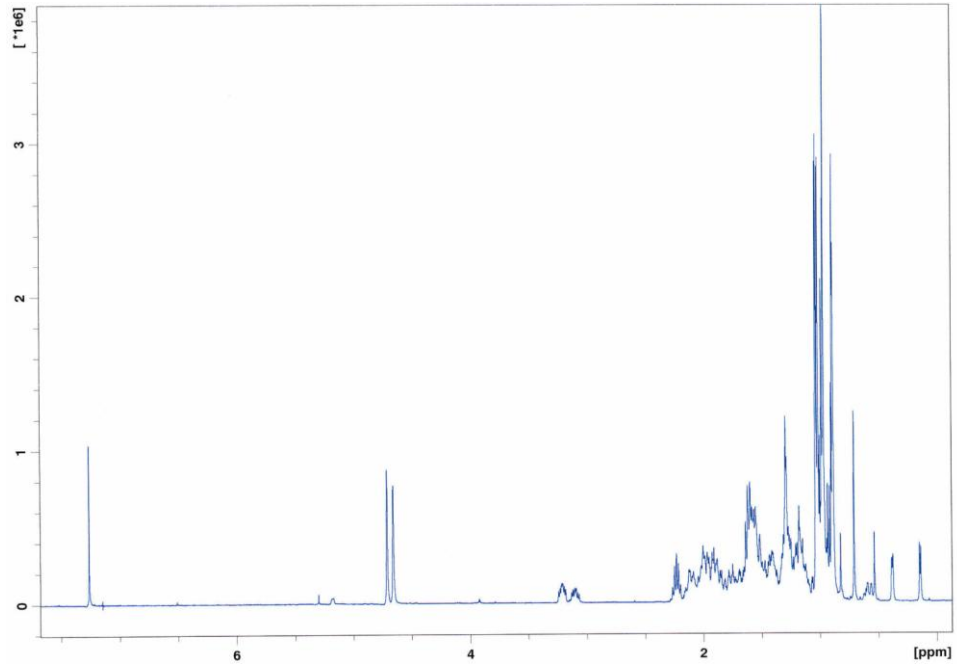


Figura 50 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G23.

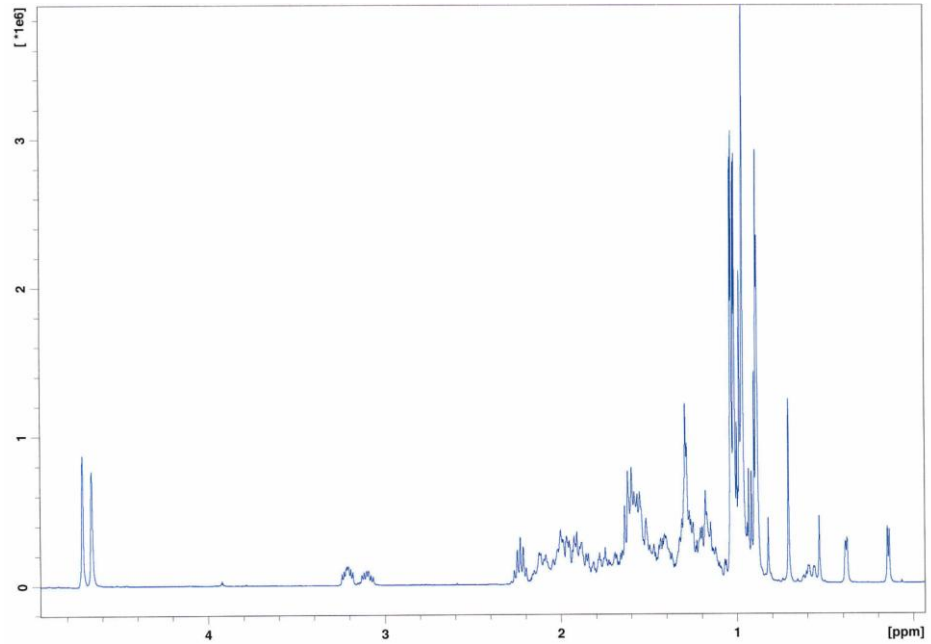


Figura 51 – Detalhe da expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo G23.

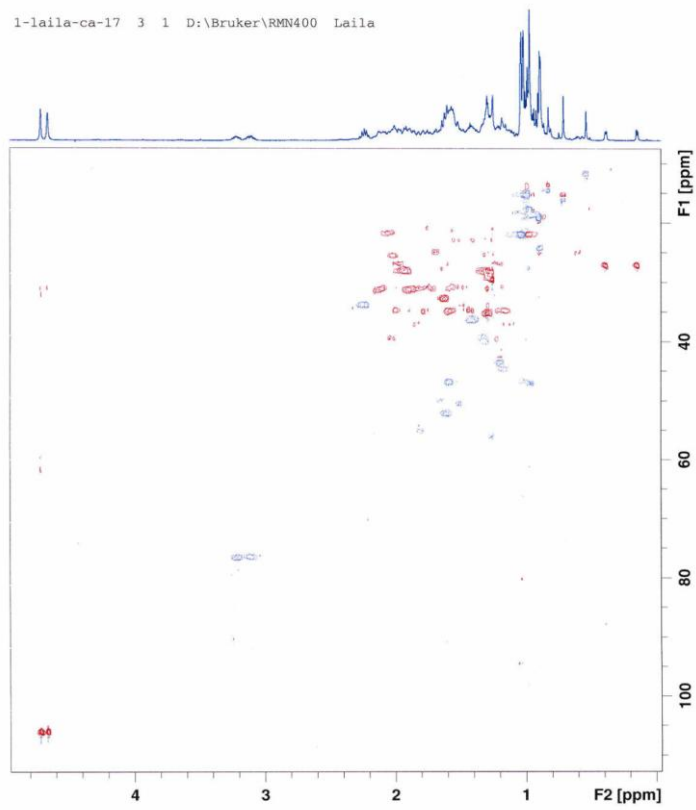


Figura 52 – Espectro HSQC do grupo G17.

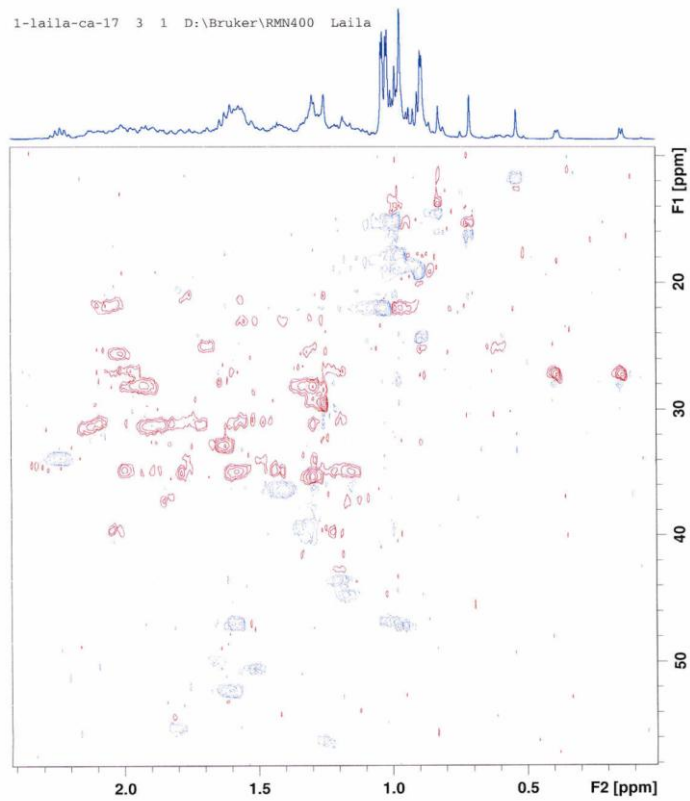


Figura 53 – Expansão do espectro HSQC do grupo G17.

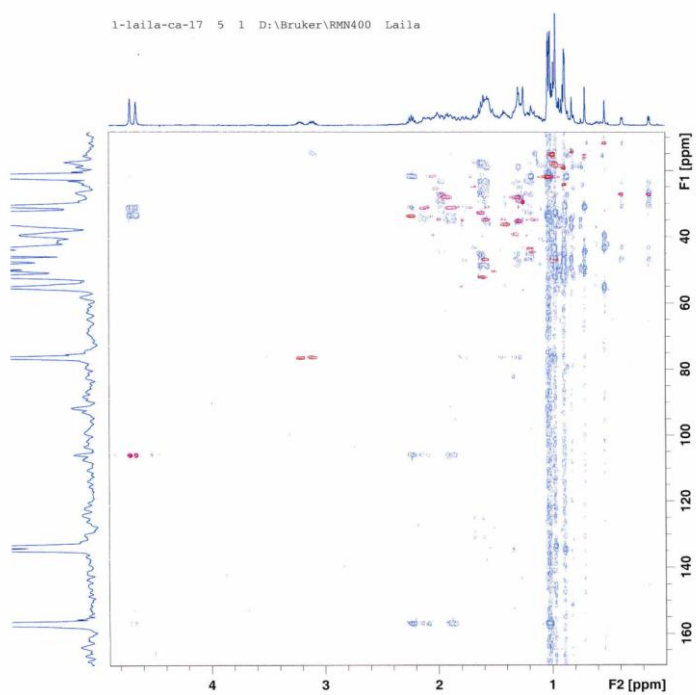


Figura 54 – Espectro HMBC do grupo G17.

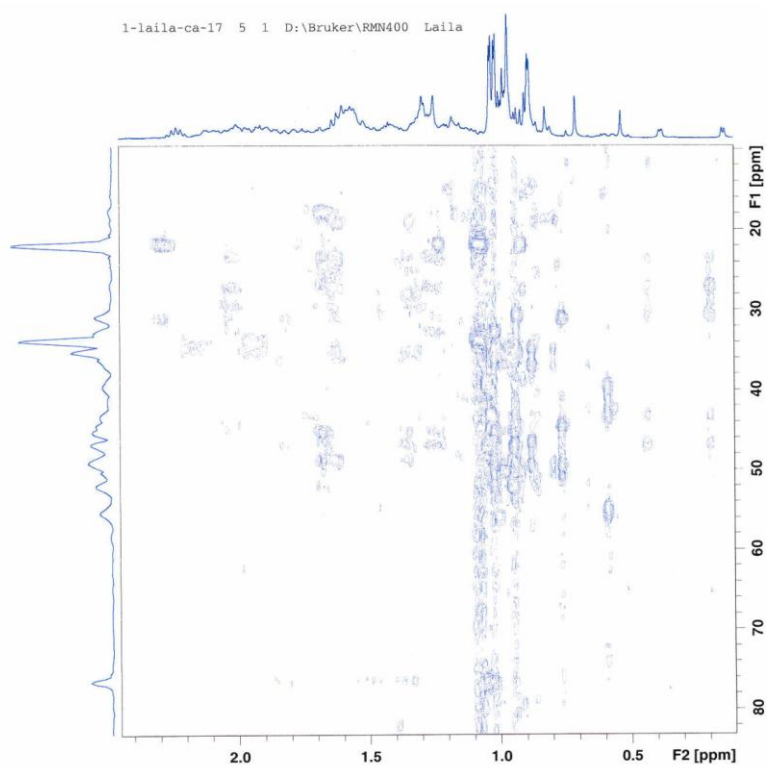


Figura 55 – Expansão do espectro HMBC do grupo G17.

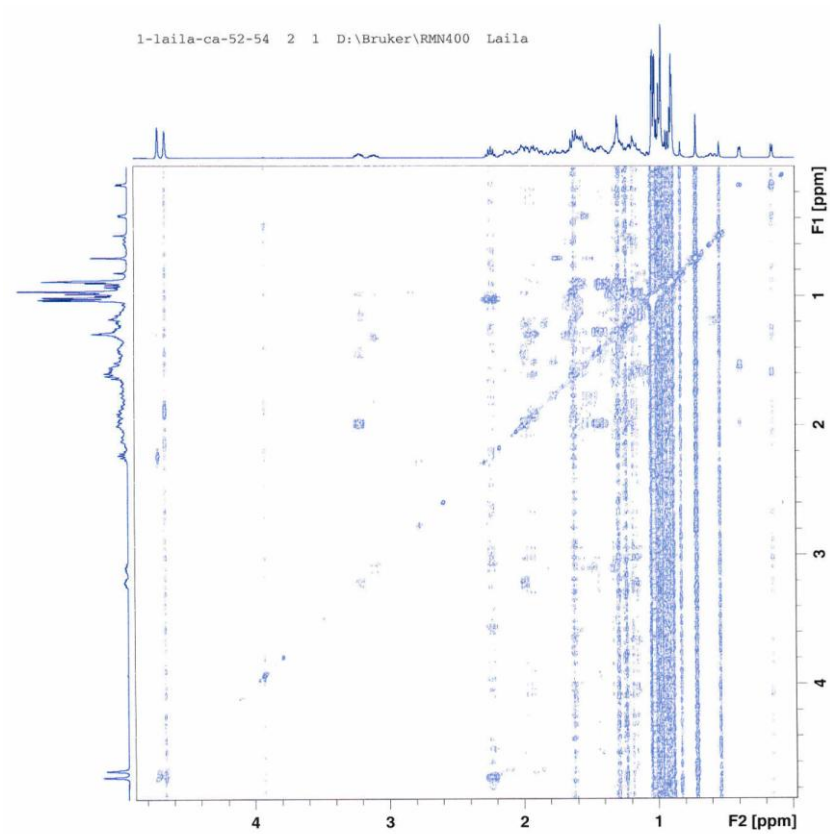


Figura 56 – Espectro COSY do grupo G23.

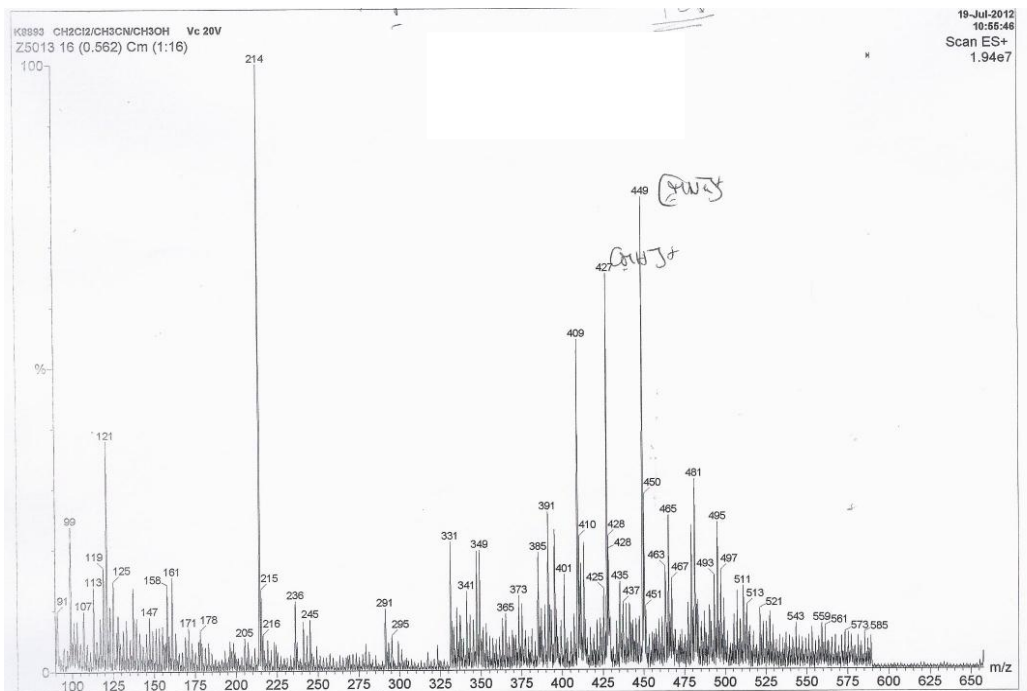


Figura 57 – Espectro de massa do grupo G17 em modo positivo $[M+H]^+$.

Os grupos G17 e G18 foram submetidos ao teste de microdiluição para determinação dos valores de CIM em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. A concentração da amostra no primeiro poço foi de 250 µg/mL. Não foi demonstrada atividade antifúngica.

Os grupos G17 e G18 também foram avaliados quanto ao potencial antitumoral *in vitro* em quatro linhagens de células por meio do ensaio de citotoxicidade (Tabela 9). O grupo G17 exibiu atividade citotóxica (CI₅₀ 9,2 µg/mL) na linhagem leucêmica HL-60. Os dois grupos não exibiram atividade citotóxica nas linhagens HCT-116, OVCAR-8 e SF-295 (CI₅₀ > 25 µg/mL).

Tabela 9 – Valores de CI₅₀ (µg/mL) dos grupos G17 e G18 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL.

AMOSTRAS	HL-60 (CI ₅₀ µg/mL)	HCT-116 (CI ₅₀ µg/mL)	OVCAR-8 (CI ₅₀ µg/mL)	SF-295 (CI ₅₀ µg/mL)
G17	9,2 (8,1-10,4)	> 25	> 25	> 25
G18	> 25	> 25	> 25	> 25
Doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09-0,17)	0,26 (0,17-0,3)	0,24 (0,2-0,27)

Na literatura, há apenas descrição da atividade inibidora da aromatase para o triterpeno. Cicloeucalenol isolado de extrato fluido do pólen de *Brassica rapa* L. (Brassicaceae) exibiu atividade *in vitro* inibidora da aromatase (CI₅₀ 0,45 mM e taxa de inibição de 56,3%), enzima envolvida com a hiperplasia prostática benigna (LI *et al.*, 2009).

4.4.2 Tremulona

A partir do fracionamento da reunião dos grupos G5 a G7, provenientes do extrato acetato de etila das folhas, obteve-se o grupo G51, que foi submetido à CG/EM. Dentre os metabólitos existentes, identificou-se a tremulona (Figura 58) por comparação dos dados obtidos por CG/EM com a biblioteca de dados (Figura 59).

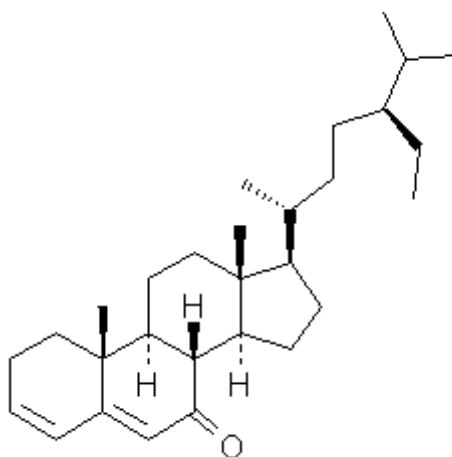


Figura 58 – Estrutura molecular da tremulona.

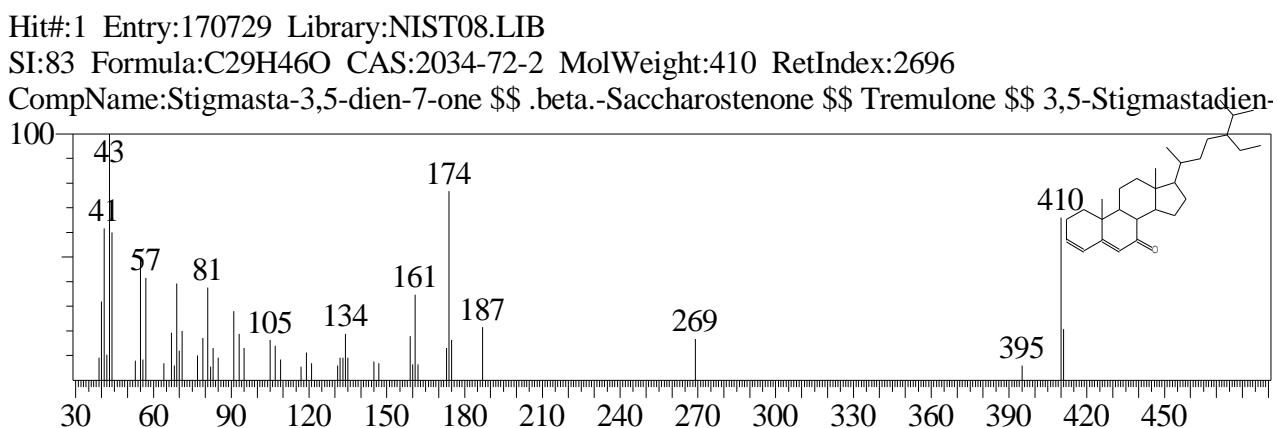


Figura 59 – Espectro de massas da tremulona obtido por impacto eletrônico (70 eV).

A tremulona é uma cetona esteroidal cristalina de odor agradável (ABRAMOVITCH & MICETICH, 1962). Há descrições de seu isolamento a partir do cerne da madeira de *Populus tremuloïdes* (Salicaceae) (ABRAMOVITCH & MICETICH, 1962), da casca de *Pinus monticola* (Pinaceae) (CONNER *et al.*, 1980) e

dos grãos de *Sorghum bicolor* (Poaceae), o sorgo (AVATO *et al.*, 1990). Não há relatos de atividades biológicas para a tremulona na literatura.

4.4.3 β -amirina e lupeol

O grupo G6, oriundo do fracionamento do extrato acetato de etila das folhas, foi submetido à análise em CG/EM. Dentre os metabólitos existentes, dois triterpenos pentacíclicos – β -amirina e lupeol (Figuras 60 e 61) – foram identificados por comparação dos dados obtidos por CG/EM com a biblioteca de dados (Figuras 62 e 63). O primeiro é um triterpeno pentacíclico do tipo oleanano, enquanto o segundo é um triterpeno pentacíclico do tipo lupano. Lupeol é também conhecido como clerodol, fagarsterol e lupenol (GALLO & SARACHINE, 2009).

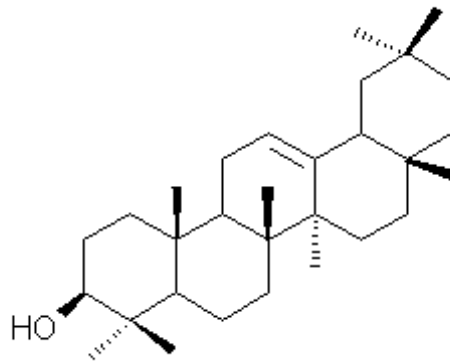


Figura 60 – Estrutura molecular da β -amirina.

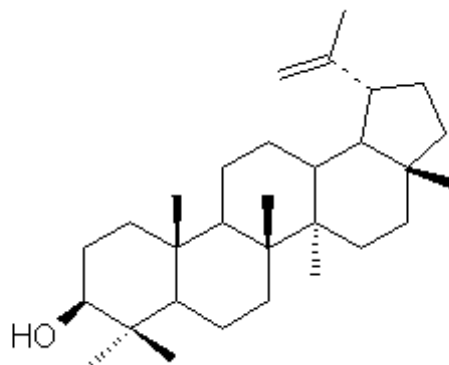


Figura 61 – Estrutura molecular do lupeol.

Hit#:1 Entry:32 Library:MY LIBRARY.lib
 SI:92 Formula:C30 H50 O CAS:559-70-6 MolWeight:426 RetIndex:0
 CompName:Beta-amirina

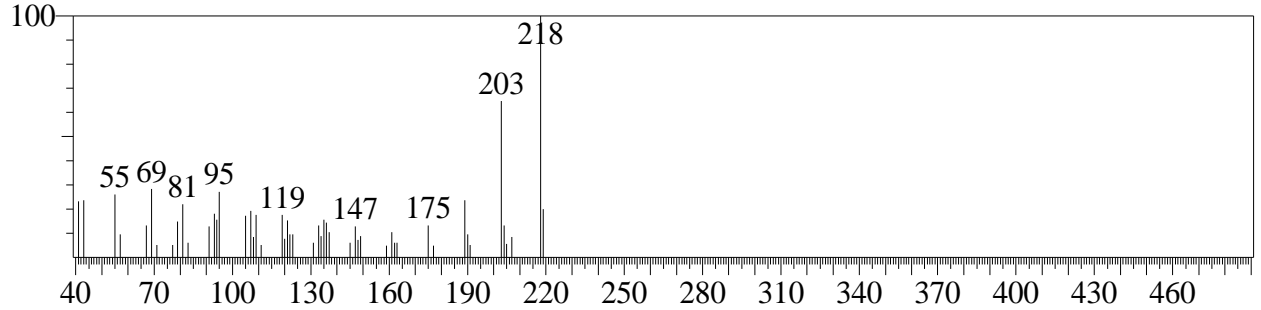


Figura 62 – Espectro de massas da β -amirina obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Hit#:1 Entry:174613 Library:NIST08.LIB
 SI:93 Formula:C30H50O CAS:545-47-1 MolWeight:426 RetIndex:2848
 CompName:Lupeol \$\$ Lup-20(29)-en-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lup-20(29)-en-3.beta.-ol \$\$.beta.-Viscol \$\$

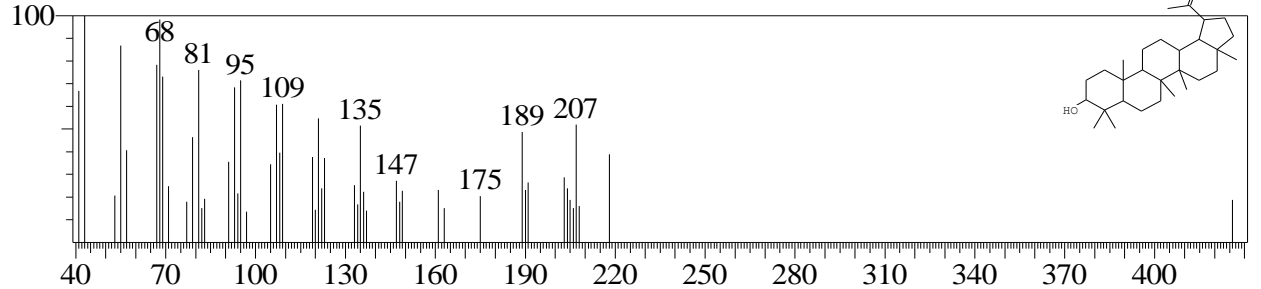


Figura 63 – Espectro de massas do lupeol obtido por impacto eletrônico (70 eV).

No teste de microdiluição para determinação da CIM, o grupo G6 não apresentou atividade antifúngica. A concentração da amostra no primeiro poço foi de 250 $\mu\text{g/mL}$. No teste de citotoxicidade, o grupo exibiu atividade em todas as linhagens com CI_{50} variando de 10,2 a 17,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do grupo G6 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 $\mu\text{g/mL}$.

AMOSTRAS	HL-60	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)
G6	15,7 (13,5-18,3)	10,3 (7,6-14,1)	10,2 (5,5-18,8)	17,5 (15,6-19,5)
Doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09-0,17)	0,26 (0,17-0,3)	0,24 (0,2-0,27)

A β -amirina isolada de extrato metanólico das folhas de *Ardisia elliptica* (Primulaceae) mostrou-se mais potente que a aspirina na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno – CI_{50} de 4,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o da aspirina foi de 11 $\mu\text{g/mL}$ (CHING *et al.*, 2010). Associada ao seu isômero, α -amirina, a mistura triterpênica exibiu atividade hepatoprotetora em modelo de lesão hepática induzida por acetaminofeno em camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O lupeol está presente em diversas famílias de plantas, podendo ser encontrado em uvas, avelãs, óleo de oliva, manteiga de cacau, polpa da manga, própolis, entre outros (GALLO & SARACHINE, 2009). O lupeol apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, sendo estudado há mais de um século. Dentre essas atividades, as principais investigadas são antitumoral, anti-inflamatória, cardio, gastro e hepatoprotetor e regenerador epidermal (GALLO & SARACHINE, 2009). β -amirina e lupeol também foram isolados de flores da família Compositae (Asteraceae) e inibiram inflamação induzida por TPA em camundongos (DI_{50} 0,4 e 0,6 mg/orelha, respectivamente) (AKIHISA *et al.*, 1996).

4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL DE OUTROS GRUPOS OBTIDOS DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAIZ DE *A. fraxinifolium*

Os grupos G39, G45, G48 e G52, obtidos do fracionamento da amostra de 3,15 g em coluna aberta de sílica, foram avaliados quanto à atividade antifúngica (Tabela 11). A concentração da amostra no primeiro poço foi de 250 µg/mL. Os grupos G48 e G52 apresentaram os melhores valores de CIM (31,25 µg/mL) em leveduras. O grupo G45 exibiu menor atividade em *C. albicans* ATCC 10231 (125 µg/mL) e em *C. parapsilosis* ATCC 22019 (62,50 µg/mL). Tais resultados demonstram que é nesses grupos que se encontra a atividade antifúngica observada para o extrato acetato de etila da casca da raiz.

Tabela 11 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) dos grupos G39, G45, G48 e G52 em leveduras.

AMOSTRAS	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
	(CIM µg/mL)	(CIM µg/mL)
G39	> 250	> 250
G45	125	62,50
G48	31,25	31,25
G52	31,25	31,25
Itraconazol	0,125	0,25
Fluconazol	2	2

Os grupos G39, G45, G48 e G52 também foram avaliados quanto ao potencial antitumoral. O grupo G39 demonstrou atividade significativa com valores de CI_{50} variando de 1,6 a 2,5 µg/mL para as quatro linhagens tumorais avaliadas

(Tabela 12) . A elucidação da estrutura molecular das substâncias presentes nesses grupos está sendo finalizada.

Tabela 12 – Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos grupos G39, G45, G48, G52 com intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 $\mu\text{g/mL}$.

AMOSTRAS	HL-60	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)	(CI_{50} $\mu\text{g/mL}$)
G39	1,6 (1,2-2,1)	2,2 (1,8-2,7)	1,7 (1,2-2,4)	2,5 (1,9-3,4)
G45	> 25	> 25	> 25	> 25
G48	> 25	> 25	> 25	> 25
G52	> 25	> 25	> 25	> 25
Doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09-0,17)	0,26 (0,17-0,3)	0,24 (0,2-0,27)

5 CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica e biológica da espécie do Cerrado - *Astronium fraxinifolium* Schott. contribuiu para o conhecimento da quimiotaxonomia de Anacardiaceae. Os compostos 3- β -cicloartenol **(1)**, 3- β -cicloeucaleanol **(2)**, β -amirina **(4)** e lupeol **(5)** pertencem à classe dos terpenos; e a tremulona **(3)** pertence à classe dos esteróides. Esses resultados corroboram os dados da literatura reportando as duas classes de metabólitos secundários comuns em Anacardiaceae. Ademais, é o primeiro relato do isolamento/identificação dessas substâncias em *A. fraxinifolium*.

Os resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) permitiram classificar a atividade antifúngica de treze extratos de *A. fraxinifolium* em cepas ATCC e isolados clínicos de leveduras e dermatófitos. Observou-se que os extratos de média (acetato de etila) e alta (etanólico) polaridades das cascas do caule e da raiz exibiram os melhores valores de CIM (0,24 a 125 $\mu\text{g/mL}$) nas leveduras e na maioria dos dermatófitos testados.

Dos extratos mais ativos, selecionou-se o extrato acetato de etila da casca da raiz para o fracionamento cromatográfico, pois, além de exibir o maior espectro de ação antifúngica, sua média polaridade e a quantidade de material disponível eram adequadas para o estudo químico. O fracionamento rendeu o isolamento de dois triterpenos do tipo cicloartano **(1)** e **(2)**. O uso na medicina tradicional do óleo extraído da casca e dos frutos de *A. fraxinifolium* como cáustico e irritante, e seu emprego no tratamento de calos (BRAGA, 1976), nos inspirou a avaliar a propriedade citotóxica dos compostos isolados. **(1)** e **(2)** apresentaram atividade antitumoral em células leucêmicas HL-60 com CI_{50} de 10,8 $\mu\text{g/mL}$ e 9,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O grupo G39, obtido também desse fracionamento, exibiu os melhores valores de CI_{50} nas quatro linhagens tumorais avaliadas (CI_{50} de 1,6 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$). Os grupos G45, G48 e G52 apresentaram atividade em cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (CIM de 31,25 a 125 $\mu\text{g/mL}$). A elucidação da estrutura molecular de G39, G45, G48 e G52 está em finalização.

Com o interesse em contribuir à quimiotaxonomia de Anacardiaceae, com a espécie do Cerrado - *A. fraxinifolium*, o extrato acetato de etila das folhas foi fracionado, sendo identificados por CG/EM os compostos tremulona **(3)**, β -amirina **(4)** e lupeol **(5)**.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam o potencial antifúngico e antitumoral de *A. fraxinifolium* e reforçam a necessidade de se prosseguir com o estudo dessa espécie ainda pouco estudada quanto à fitoquímica e à farmacologia. Os dados também evidenciam a importância da preservação da biodiversidade do Cerrado para a investigação de novos agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, R. A.; MICETICH, R. G. Extractives from *Populus tremuloïdes* heartwood. The structure and synthesis of tremulone. **Canadian Journal of Chemistry**, 40(10): 2017-2022, 1962.
- ACCIOLY, M. P.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C. M.; DE MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; ALMEIDA, C. A.; DE ANDRADE JÚNIOR, H. F.; CARDOSO, R. P. A. Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary Parasitology**, 187(1-2): 79-84, 2012.
- AGUIAR A.V., BORTOLOZO F.R., MORAES M.L.T., de SÁ, M.E. Determinação de parâmetros genéticos em população de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) através das características fisiológicas da semente. **Scientia Florestalis**, 60, 89-97, 2001.
- AGUILAR-ORTIGOZA, C. J.; SOSA, V.; AGUILAR-ORTIGOZA, M. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. **Economic Botany**, 57(3): 354-364, 2003.
- AGUILAR-ORTIGOZA, C. J.; SOSA, V. The evolution of toxic phenolic compounds in a group of Anacardiaceae genera. **Taxon**, 53(2): 357-364, 2004.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, 43(6): 1255-1260, 1996.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; YAMAURA, M.; UKIYA, M.; KIMURA, Y.; SHIMIZU, N.; ARAI, K. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(6): 2313-2319, 2000.
- ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, 131(1): 116-121, 2010.
- ALHO, C. J. R. Desafios para a conservação do Cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: FELFILI, J. M.; SOUSA-SILVA, J. C.; SCARIOT, A. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 367-381 p.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1998.
- ANDES, D. R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J. W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; PAPPAS, P. G.; KULLBERG, B. J. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. **Clinical Infectious Diseases**, 54(8): 1110-1122, 2012.
- ANJANEYULU, V.; HARISCHANDRA PRASAD, K.; RAVI, K.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids from *Mangifera indica*. **Phytochemistry**, 24(10): 2359-2367, 1985.
- ANJANEYULU, V.; SURESH BABU, J.; CONNOLLY, J. D. 29-hydroxymangiferonic acid from *Mangifera indica*. **Phytochemistry**, 35(5): 1301-1303, 1994.

AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; PASSOS, F. B. **Módulos para recuperação de Cerrado com espécies nativas de uso múltiplo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

ARENDRUP, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, 20(6): 42-48, 2014.

ARIF, T.; BHOSALE, J. D.; KUMAR, N.; MANDAL, T. K.; BENDRE, R. S.; LAVEKAR, G. S.; DABUR, R. Natural products – anti-fungal agentes derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, 11(7): 621-638, 2009.

AVATO, P.; BIANCHI, G.; MURELLI, C. Aliphatic and cyclic lipid components of *Sorghum* plant organs. **Phytochemistry**, 29(4): 1073-1078, 1990.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, O. S.; UKPONMWAN, O. E. Medicinal and economic value of *Spondias mombim*. **African Journal of Biomedical Research**, 11: 129-136, 2008.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Volume 2. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.

BENNETT, J. E. In: Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª edição. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2005.

BOAR, R. B.; ROMER, C. R. Cycloartane triterpenoids. **Phytochemistry**, 14(5-6): 1143-1146, 1975.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza, 3ª edição, 540 p., 1976.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 111(2): 396-402, 2007.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 528 p., 2002.

BRASIL. Presidência da República. Decreto 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. 2006.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **Plos Pathogens**, 8(9): 1-3, 2012.

CALDEIRA JÚNIOR, C. F.; de SOUZA, R. A.; MARTINS, E. R.; SAMPAIO, R. A. Capacidade de recuperação de área degradada pelo Gonçalo-Alves (*Astronium fraxinifolium* Schott) sob adubação com lodo de esgoto e silicato. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(1): 480-482, 2007.

CECÍLIO, A. B.; DE FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; DE OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; DE ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, 141(3): 975-981, 2012.

CHING, J.; CHUA, T. K.; CHIN, L. C.; LAU, A. J.; PANG, Y. K.; JAYA, J. M.; TAN, C. H.; KOH, H. L. β -Amyrin from *Ardisia elliptica* Thunb. is more potente than aspirin in inhibiting

collagen-induced platelet aggregation. **Indian Journal of Experimental Biology**, 48:275-279, 2010.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science & Technology**, 9(4): 168-175, 1998.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. In: In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CONNER, A. H.; NAGASAMPAGI, B. A.; ROWE, J. W. Terpenoid and other extractives of western white pine bark. **Phytochemistry**, 19(6): 1121-1131, 1980.

CORRÊA, A. Manuel Pio. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, 1ª edição, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1978.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, 29(6): 1287-1300, 2006.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, 30(4): 1129-1130, 1991.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4): 564-582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agentes. **Journal of Ethnopharmacology**, 100(1-2): 72-29, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1830(6): 3670-3695, 2013.

DA COSTA, R. C.; SANTANA, D. B.; ARAÚJO, R. M.; DE PAULA, J. E.; DO NASCIMENTO, P. C.; LOPES, N. P.; BRAZ-FILHO, R.; ESPINDOLA, L. S. Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 22(1): 135-140, 2014.

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against câncer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, 123(3): 439-445, 2009.

DING, Y.; NGUYEN, H. T.; KIM, S. I.; KIM, H. W.; KIM, Y, K. The regulation of inflammatory cytokine secretion in macrophage cell line by the chemical constituents of *Rhus sylvestris*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19(13): 3607-3610, 2009.

DI SANTO, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Natural Product Reports**, 27(7): 1084-1098, 2010.

DURU, M. E.; ÇAKIR, A.; KORDALI, S.; ZENGİN, H.; HARMANDAR, M.; İZUMI, S.; HIRATA, T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. **Fitoterapia**, 74(1-2): 170-176, 2003.

ENGELS, C.; KNÖDLER, M.; ZHAO, Y.; CARLE, R.; GÄNZLE, M.; SCHIEBER, A. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(17): 7712-7718, 2009.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; LOZADA, M. C.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S.; VILLARREAL, M. L.; GNECCO, D.; ENRÍQUEZ, R. G.; REYNOLDS, W. ¹H and ¹³C NMR characterization of new cycloartane triterpenes from *Mangifera indica*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 50(1): 52-57, 2012.

FALCONE, M.; CONCIA, E.; IORI, I.; LO CASCIO, G.; MAZZONE, A.; PEA, F.; VIOLI, F.; VENDITTI, M. Identification and management of invasive mycoses in internal medicine: a road-map for physicians. **Internal and Emergency Medicine**, 2014. DOI 10.1007/s11739-014-1077-4.

FAVRE-GODAL, Q.; DORSAZ, S.; QUEIROZ, E. F.; CONAN, C.; MARCOURT, L.; WARDOJO, B. P. E.; VOINESCO, F.; BUCHWALDER, A.; GINDRO, K.; SANGIARD, D.; WOLFENDER, J. L. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. **Phytochemistry**, 1-11, 2014.

FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J. F.; FAGG, C. W.; MACHADO, J. W. B. **Cerrado: manual para recuperação de Matas de Galeria**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2000.

FELFILI, J. M.; DA SILVA JÚNIOR, M. C. Diversidade alfa e beta no cerrado sensu strictu, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: FELFILI, J. M.; SOUSA-SILVA, J. C.; SCARIOT, A. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 140-154 p.

FLINT, W. W.; CAIN, J. D. Nail and skin disorders of the foot. **The Medical Clinics of North America**, 98(2): 213-225, 2014.

FRANCO, A. C. Biodiversidade de forma e função: implicações ecofisiológicas das estratégias de utilização de água e luz em plantas lenhosas do Cerrado. In: FELFILI, J. M.; SOUSA-SILVA, J. C.; SCARIOT, A. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 179-196 p.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological Activities of Lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, 3(1): 46-66, 2009.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 46(3): 225-234, 2010.

HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nature Immunology**, 13(9): 817-822, 2012.

HENRIQUES, R. P. B. Influência da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma do Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Orgs.) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 73-92 p.

HERNÁNDEZ, V.; MORA, F.; ARAQUE, M.; DE MONTIJO, S.; ROJAS, L.; MELÉNDEZ, P.; DE TOMMASI, N. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq. essential oil. **Revista Latinoamericana de Química**, 41(2): 89-94, 2013.

HERNÁNDEZ, V.; MALAFRONTA, N.; MORA, F.; PESCA, M. S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T. Antioxidant and antiangiogenic activity of *Astronium graveolens* Jacq. leaves. **Natural Product Research**, 28(12): 917-922, 2014.

IBAMA. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010**. Brasília. 2011. Disponível em <http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/cerrado>. Acesso em 6 de novembro de 2013.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A. R. S.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M. A.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 9(30): 1-6, 2010.

KHAN, M. A.; NIZAMI, S. S.; KHAN, M. N. I.; AZEEM, S. W.; AHMED, Z. New triterpenes from *Mangifera indica*. **Journal of Natural Products**, 57(7): 988-991, 1994.

KIKUCHI, T.; KADOTA, S.; TSUBONO, K. Studies on the constituents of Orchidaceous Plants. IV. Proton and Carbon-13 signal assignments of cycloeucalenol-type triterpenes from *Nervilia purpurea* SCHLECHTER by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 34(6): 2479-2486, 1986.

KOLESNIKOVA, M. D.; XIONG, Q.; LODEIRO, S.; HUA, L.; MATSUDA, S. P. T. Lanosterol biosynthesis in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 447(1): 87-95, 2006.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 112(2): 237-242, 2007.

KONÉ, W. M.; SORO, D.; DRO, B.; YAO, K.; KAMANZI, K. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory properties of *Lannea barteri* (Anacardiaceae). **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 5(10): 1516-1523, 2011.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 64(1): 79-84, 1999.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, 5(1): 63-77, 2002.

LI, Y. H.; YANG, Y. F.; LI, K.; JIN, L. L.; YANG, N. Y.; KONG, D. Y. 5 Alpha-Reductase and Aromatase Inhibitory Constituents from *Brassica rapa* L. Pollen. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 57(4): 401-404, 2009.

LIU, C.; YANG, H.; ZHANG, L.; ZHANG, Q.; CHEN, B.; WANG, Y. Biotoxins for cancer therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 15 (12): 4753-4758, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544p.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. **Phytochemistry**, 44(7): 1185-1236, 1997.

MAIA, J. G. S.; DA SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; CARREIRA, L. M. M. Essential oils from *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. and *A. fraxinifolium* Schott ex Spreng. **Flavour and Fragrance Journal**, 17(1): 72-74, 2002.

MARČETIĆ, M.; BOŽIĆ, D.; MILENKOVIĆ, M.; MALEŠEVIĆ, N.; RADULOVIĆ, S.; KOVAČEVIĆ, N. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygia* Scop. **Phytotherapy Research**, 27(11): 1658-1663, 2013.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. B.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. **Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Org.) Cerrado: ecologia e flora. Brasília: Embrapa Cerrados, 2008. P. 213-228.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade do Cerrado e do Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação**. Brasília: MMA, 2007. 540 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado**. Brasília: MMA, 2011. 200 p.

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, F. M. D.; BARBOSA, M. C. A. Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, 17(8): 9728-9740, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1-2): 55-63, 1983.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, 91: 3-20, 2001.

MUSCHIETTI, L.; DERITA, M.; SÜLSEN, V.; MUÑOZ, J. D.; FERRARO, G.; ZACCHINO, S.; MARTINO, V. In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 102(2): 233-238, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858, 2000.

NENOFF, P.; KRÜGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIETZ, H. J. Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal of the German Society of Dermatology**, 12(3): 188-209, 2014

NES, W. D.; KOIKE, K.; JIA, Z.; SAKAMOTO, Y.; SATOU, T.; NIKAIKO, T.; GRIFFIN, J. F. β ,19-Cyclosterol analysis by ^1H and ^{13}C NMR, crystallographic observations and molecular

mechanics calculations. **Journal of the American Chemical Society**, 120(24): 5970-5980, 1998.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. **Journal of Natural Products**, 52(1): 1-31, 1989.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; LIMA, R. C. Jr.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of alpha- and beta amyryn, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 98(1-2):103-108, 2005.

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, 165(6): 496-504, 2010.

ÖZÇELİK, B.; ASLAN, M.; ORHAN, I.; KARAOĞLU, T. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*. **Microbiological Research**, 160: 159-164, 2005.

PAN, L.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. The continuing search for antitumor agentes from higher plants. **Phytochemistry Letters**, 3(1): 1-8, 2010.

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *Plos One*, 9(7): 1-12, 2014

PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, 29(8): 838-842, 2010.

PIRES, C. A. A.; LOBATO, A. M.; CARNEIRO, F. R. O.; DA CRUZ, N. F. S.; DE SOUSA, P. O.; MENDES, A. M. D. Clinical, epidemiological and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 89(2): 259-264, 2014.

RAHIER, A.; CATTEL, L.; BENVENISTE, P. Mechanism of the enzymatic cleavage of the 9 β ,19-cyclopropane ring of cycloeucalenol. **Phytochemistry**, 16(8): 1187-1192, 1977.

RAHIER, A. Dissecting the sterol C-4 demethylation process in higher plants. From structures and genes to catalytic mechanism. **Steroids**, 76(4): 340-352, 2011.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, 80(3): 223-230, 1997.

RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S.; RATTER, J. A.; SOUSA-SILVA, J. C. Ocupação do bioma Cerrado e conservação da sua diversidade vegetal. In: FELFILI, J. M.; SOUSA-SILVA, J. C.; SCARIOT, A. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 382-399 p.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2008. 1279p.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R. M. Natural triterpenoids as anti-inflammatory agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, 22: 93-143, 2000.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100(1-2): 80-84, 2005.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil – manual de dendrologia brasileira**. São Paulo, 294 p., 1971.

ROUMY, V.; FABRE, N.; PORTET, B.; BOURDY, G.; ACEBEY, L.; VIGOR, C.; VALENTIN, A.; MOULIS, C. Four anti-protozoal and anti-bacterial compounds from *Tapirira guianensis*. **Phytochemistry**, 70(2): 305-311, 2009.

SALOMÃO, A. N.; SILVA, J. A. **Reserva Genética Florestal Tamanduá**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**, 11(2-3): 230-234, 2004.

SANTIN, D. A. Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e revalidação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allem. (Anacardiaceae) Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SANTOS, S. C.; DE MELLO, J. C. P. Taninos, In: SIMÕES *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 615-656 p.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, 30(12): 3875-3883, 1991.

SHAHIDI BONJAR, G. H. Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. **Fitoterapia**, 75(1): 74-76, 2004.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. **Journal of Chromatography A**, 822: 167-171, 1998.

SHARMA, K.; SHUKLA, S. D.; MEHTA, P.; BHATNAGAR, M. Fungistatic activity of *Semecarpus anacardium* Linn. f nut extract. **Indian Journal of Experimental Biology**, 40(3): 314-318, 2002.

SHEPPARD, D.; LAMPIRIS, H. W. In: Katzung, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10ª edição. Porto Alegre, AMGH Editora Ltda., 2010.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; MEIRELES, T. E. F.; OLIVEIRA, L. M. P.; DIÓGENES, M. J. N. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SINGH, M.; KHATOON, S.; SINGH, S.; KUMAR, V.; RAWAT, A. K.; MEHROTRA, S. Antimicrobial screening of ethnobotanically importante stem bark of medicinal plants. **Pharmacognosy Research**, 2(4): 254-257, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Editora Artmed, 2012.

VAN BURIK, J. A. H.; MAGEE, P. T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Annual Review of Microbiology**, 55: 743-772, 2001.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, 1-26, 2012.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, 10(2-3): 189-195, 2003.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, 115(1): 140-146, 2008.

WAHL, O.; OSWALD, M.; TRETZEL, L.; HERRES, E.; AREND, J.; EFFERTH, T. Inhibition of tumor angiogenesis by antibodies, synthetic small molecules and natural products. **Current Medicinal Chemistry**, 18 (21): 3136-3155, 2011.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 21(10): 1072-1076, 1998.

YORDANOV, M.; DIMITROVA, P.; PATKAR, S.; SASO, L.; IVANOVSKA, N. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. **Canadian Journal of Microbiology**, 54(6): 435-440, 2008.

ZACHARAKI, P. STEPHANOU, G.; DEMOPOULOS, N. A. Comparison of the aneugenic properties of nocodazole, paclitaxel and griseofulvin *in vitro*. Centrosome defects and alterations in protein expression profiles. **Journal of Applied Toxicology**, 33(9): 869-879, 2013.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, S. R. B.; FRAMIL, V. M. S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.