

PHELLIPE NORATO ESTRELA TERRA THEODORO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TANINO ISOLADO DE PLANTA DO CERRADO

BRASÍLIA, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

PHELLIPE NORATO ESTRELA TERRA THEODORO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TANINO ISOLADO DE PLANTA DO CERRADO

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espindola

Brasília

2014

PELLIPE NORATO ESTRELA TERRA THEODORO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TANINO ISOLADO DE PLANTA DO CERRADO

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Aprovado em 08 de Abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Laila Salmen Espindola  
Universidade de Brasília - UnB

João Carlos Palazzo de Mello  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Maria do Rosário Rodrigues Silva  
Universidade Federal do Goiás – UFG

Maria Sueli Felipe  
Universidade de Brasília - UnB

Marcilio Sérgio Soares da Cunha Filho  
Universidade de Brasília - UnB

Guilherme Martins Gelfuso  
Universidade de Brasília - UnB

A Deus,

## AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado a todos os que contribuíram e participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espíndola**, meus profundos agradecimentos pelos ensinamentos, orientação, confiança e contribuição para meu desenvolvimento intelectual e como pessoa.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva**, pela colaboração com o fornecimento dos isolados clínicos, sem os quais seria impossível o desenvolvimento desse trabalho, além de receber-me em seu laboratório compartilhando conhecimentos e pelo aceite de integrar essa banca.

Ao **Prof. Dr. José Elias de Paula**, pela fundamental atuação no funcionamento do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília. Agradeço pela coleta das plantas, agradáveis conversas e ensinamentos. Dedico esse trabalho ao senhor e sei que onde estiver estará cuidando de nós.

Aos professores **Dr. João Carlos Palazzo de Mello**, **Dr. Marcilio Sérgio Soares da Cunha Filho**, **Dr. Guilherme Martins Gelfuso** e **Dra. Maria Sueli Felipe** pelo aceite de integrar essa banca.

À **Camila, Renata, Cecília, Pedro, Paula, Mariana, Lorena, Éverton, Sílvia, Gabriela** amigos que conheci no laboratório e que levarei por toda a minha vida, obrigado pela amizade ofertada, pelos conhecimentos, sugestões, ideias e pelas conversas na cantina regadas com gostosas gargalhadas.

Aos meus eternos amigos **Daniel Augusto Teixeira de Miranda** e **Gabriel Camelo Vilas Boas** que me acompanham desde meus cinco anos, compartilhando as alegrias. Muito obrigado pelo carinho, pelas ideias, pelas noites de farra e pela compreensão da minha ausência em algumas festividades. A vida é mais fácil quando se tem amigos como vocês.

A minha amada **Polyana Araújo de Assis**, sempre me recebendo com sorriso estampado em seu rosto, capaz de fazer sumir qualquer tristeza ou preocupação. Obrigado por me ajudar na realização dos testes, compreender as minhas ausências, torcer por mim, caminhar sempre ao meu lado nas alegrias e nos obstáculos da vida.

Aos **meus pais Abadio Admir Theodoro e Mísia Regina Terra Estrela Theodoro**, por todos os ensinamentos, lições, conversas, ideias e dicas. Tudo o que eu sou hoje, e que serei amanhã devo a vocês, agradeço a Deus por ter me dado pais tão maravilhosos. Tenho muito orgulho de terem vocês como meus pais, amo vocês!

Aos **meus irmãos Phábio Claudino Estrela Terra Theodoro e Fabrício Claudino Estrela Terra Theodoro**, pelo apoio, pelas conversas até a madrugada, pelo carinho, pelas brincadeiras e por suprir as minhas ausências. Tenho muito mais do que irmãos, tenho amigos que vivenciam a minha vida.

Pelas vezes em que não agradei, obrigado...

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio da bolsa fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

“O único lugar aonde o sucesso vem  
antes do trabalho é no dicionário.”  
(Albert Einstein)

## RESUMO

O panorama mundial das infecções fúngicas é preocupante, devido ao aumento do número de casos. O surgimento de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis e a elevada toxicidade destes fármacos justifica a busca por moléculas inovadoras. O presente trabalho avaliou extratos de *Terminalia fagifolia* Mart., planta da família Combretaceae, conhecida por capitão-do-mato é utilizada tradicionalmente para o tratamento de infecções. O extrato etanólico da madeira do caule foi selecionado para o fracionamento bioguiado pela atividade em leveduras e dermatófitos. A pesquisa reforça também a importância de se estudar e preservar o Cerrado.

Palavras- chave: *Terminalia fagifolia*, atividade antifúngica, leveduras e dermatófitos e isolados clínicos resistentes.

## ABSTRACT

The global landscape of fungal infections is of concern due to the increasing number of cases. The emergence of strains resistant to available drugs and the high toxicity of these drugs justifies the search for innovative molecules. This study evaluated extracts of *Terminalia fagifolia* Mart., Combretaceae plant family known as “capitão-do-mato” (captain of the woods) and used by traditional people of Cerrado for the treatment of infections. The ethanol extract of the stem wood was selected for fractionation by bio guided activity in yeasts and dermatophytes. The research also reinforces the importance of studying and preserving the Cerrado.

Keywords : *Terminalia fagifolia*, antifungal activity, yeasts, dermatophytes and resistant clinical isolates.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Divisão de alguns fungos patogênicos humanos segundo o filo	33
<b>Tabela 2</b> - Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas	52
<b>Tabela 3</b> – Cepas ATCC e isolados clínicos de fungos utilizados na investigação	66
<b>Tabela 4</b> – Extratos produzidos por maceração a partir de <i>T. fagifolia</i> e seus respectivos rendimentos	79
<b>Tabela 5</b> – Concentração inibitória mínima de extratos de <i>T. fagifolia</i> em leveduras, valores expressos em µg/mL	82
<b>Tabela 6</b> – Concentração inibitória mínima de extratos de <i>T. fagifolia</i> em dermatófitos, valores expressos em µg/mL	83
<b>Tabela 7</b> – Fracionamento do extrato etanólico da folha de <i>T. fagifolia</i> e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL	84
<b>Tabela 8</b> – Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>T. fagifolia</i> e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL	85
<b>Tabela 9</b> – Fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de <i>T. fagifolia</i> e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL	86
<b>Tabela 10</b> – Fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de <i>T. fagifolia</i> , e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL	87
<b>Tabela 11</b> – Fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de <i>T. fagifolia</i> (2 x 15 g), e as respectivas atividades antifúngicas	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura da parede e membrana fúngica	22
<b>Figura 2</b> – Diferenciação estrutural das hifas septadas e cenocíticas, e o desenvolvimento de um organismo a partir de um esporo.	23
<b>Figura 3</b> – Hifas aéreas e vegetativas de <i>Aspergillus niger</i> , cultivado em placa de Petri.	24
<b>Figura 4</b> – Proliferação por brotamento.	25
<b>Figura 5</b> – Crescimento na forma de levedura e na forma filamentosa, comuns em <i>Candida ssp.</i>	25
<b>Figura 6</b> – Blastósporos e clamidósporos encontrados em <i>Candida albicans</i> .	26
<b>Figura 7</b> – Tipos de esporos assexuais produzidos por fungos	27
<b>Figura 8</b> – Zigósporo, estrutura de reprodução sexuada encontrada nos Zigomicetos.	28
<b>Figura 9</b> – Ciclo de vida de <i>Rhizopus</i> , um zigomiceto.	29
<b>Figura 10</b> – Asco com oito ascósporos.	30
<b>Figura 11</b> – Ciclo de vida do <i>Eupenecillium</i> , um ascomiceto.	30
<b>Figura 12</b> – Estrutura do basidiocarpo de <i>Amanita muscaria</i>	31
<b>Figura 13</b> – Ciclo de vida genérico de um basidiomiceto.	32
<b>Figura 14</b> – Alvos celulares dos agentes antifúngicos.	39
<b>Figura 15</b> - Estrutura química dos antibióticos pneumocandina B0 e equinocandina B e dos seus derivados caspofungina, anidulafungina e micafungina.	43
<b>Figura 16</b> – Distribuição do Cerrado no Brasil.	50
<b>Figura 17</b> – As 25 áreas conhecidas como <i>hotspots</i> .	51
<b>Figura 18</b> - Foto de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. (Combretaceae)	61

<b>Figura 19a</b> – Dessecação e estabilização dos diferentes órgãos vegetais.	65
<b>19b</b> – Moinho de facas utilizado na pulverização dos órgãos vegetais	
<b>Figura 20</b> – (a) Processo de extração por maceração, (b) Filtração para a obtenção da solução da solução extrativa, (c) Concentração em rota-evaporador, (d) Armazenamento do extrato bruto a -20 °C.	66
<b>Figura 21</b> – Organograma do fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de <i>T. fagifolia</i> .	88
<b>Figura 29</b> – Efeitos (valor de CIM) dos agentes antifúngicos em presença de diferentes concentrações de $\beta$ -sitosterol.	89

## ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

C - Caule

CC - Casca do caule

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CR - Casca da raiz

DMSO - Dimetilsulfóxido

E - Etanol

F - Folhas

H - Hexano

HIV - *Human Immunodeficiency Vírus*

MOPS - Ácido 3-[N-morfolino]-propoanossulfônico

MR - Madeira da raiz

PVC - Policloreto de vinila

R - Raiz

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*

UTI - Unidade de terapia intensiva

UV - Ultra-violeta

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	21
1.1- IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS	21
1.2- CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS E ESTRUTURAIS DOS FUNGOS	22
1.3- CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS QUANTO A ESTRUTURA DE REPRODUÇÃO	27
1.3-1. ZIGOMYCOTA	28
1.3-2. ASCOMYCOTA	29
1.3-3. BASIDIOMYCOTA	31
1.3-4. FUNGOS IMPERFEITOS	32
1.3-5. DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS	33
1.4- RELAÇÃO ENTRE OS FUNGOS E O HOMEM	33
1.5- INFECÇÕES CAUSADAS PELOS FUNGOS ESTUDADOS NESSE TRABALHO	34
1.5-1. CANDIDÍASE	35
1.5-2. CRIPTOCOCOSE	36
1.5-3. DERMATOFITOSSES	36
1.6- FATORES PREDISPONETES PARA MICOSES	38
1.7- TRATAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO DAS MICOSES	39
1.7-1. ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS	39

1.7-1.1.	ANFOTERICINA B	39
1.7-1.2.	NISTATINA	40
1.7-1.3.	GRISEOFULVINA	41
1.7-1.4.	EQUINOCANDINAS	42
1.7-2.	AGENTES ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS	43
1.7-2.1.	COMPOSTOS AZÓLICOS	43
1.7-2.2.	FLUCITOSINA	45
1.7-2.3.	TERBINAFINA	46
1.8-	PANORAMA DAS INFECÇÕES POR <i>CANDIDA</i> , <i>CRYPTOCOCCUS</i> E DERMATÓFITOS	46
1.9-	IMPORTÂNCIA DA PESQUISA COM PLANTAS	48
1.10-	O BIOMA CERRADO	49
1.10-1.1.	FAMÍLIA COMBRETACEAE	51
1.10-1.2.	ESPÉCIES DA FAMÍLIA COMBRETACEAE COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	51
1.10-1.3.	SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA COMBRETACEAE	60
1.10-1.4.	<i>Terminalia fagifolia</i> - OBJETO DE ESTUDO	60
2.	OBJETIVOS	62
2.1-	OBJETIVOS GERAIS	62
2.2-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62

3. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS	63
3.2- PRODUÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	63
3.3- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	65
3.3-1. FRACIONAMENTO QUÍMICO	65
3.3-2. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES EM SÍLICA	65
3.3-3. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES EM SEPHADEX LH-20	65
3.3-4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	66
3.4- TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO	66
3.4-1. REAÇÃO DE METILAÇÃO	66
3.5- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	67
3.5-1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS	67
3.5-2. TESTE DE MICRODILUIÇÃO	68
3.5-2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS	68
3.5-2.2. PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS	68
3.5-2.3. PREPARO DO MEIO RPMI 1640	69
3.5-2.4. PREPARO DO INÓCULO DE LEVEDURAS	69
3.5-2.5. PREPARO DO INÓCULO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	70
3.5-2.6. PROCEDIMENTO DO TESTE	70

3.5-2.7.	LEITURA DOS RESULTADOS	71
3.6-	CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	71
3.7-	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONÁRIA (CIF) - TESTE IN VITRO DE INTERAÇÃO COM FÁRMACOS	72
3.8-	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO VIA MEMBRANA	72
3.8-1.	TESTE COM SORBITOL	72
3.8-2.	TESTE COM ERGOSTEROL LIVRE	73
3.8-3.	TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL	73
3.8-4.	TESTE DE CITOMETRIA DE FLUXO	75
3.9-	TESTE DE CITOXICIDADE	76
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1-	PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E TRIAGEM BIOLÓGICA	78
4.2-	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATIVOS	83
4.3-	ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA MADEIRA DO CAULE DE TERMINALIA FAGIFOLIA	85
4.4-	ATIVIDADE DO B-SITOSTEROL	88
5.	REFERÊNCIAS	90

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1- IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS

Os fungos desempenham papel de grande importância no equilíbrio da natureza. Atuam juntamente com as bactérias no processo de decomposição, em especial a decomposição de vegetais (GHIZELINI *et al.*, 2006). Essa atividade é exercida principalmente por suas enzimas extracelulares, como as celulases e pectinases que degradam estruturas rígidas de plantas, que não são digeridas por outros animais (STAMFORD *et al.*, 1998). O processo de degradação é importante para o ciclo de aproveitamento da matéria orgânica na natureza. Ao final do processo de decomposição ocorre principalmente a liberação de gás carbônico na atmosfera e a devolução de compostos nitrogenados e outros componentes para o solo.

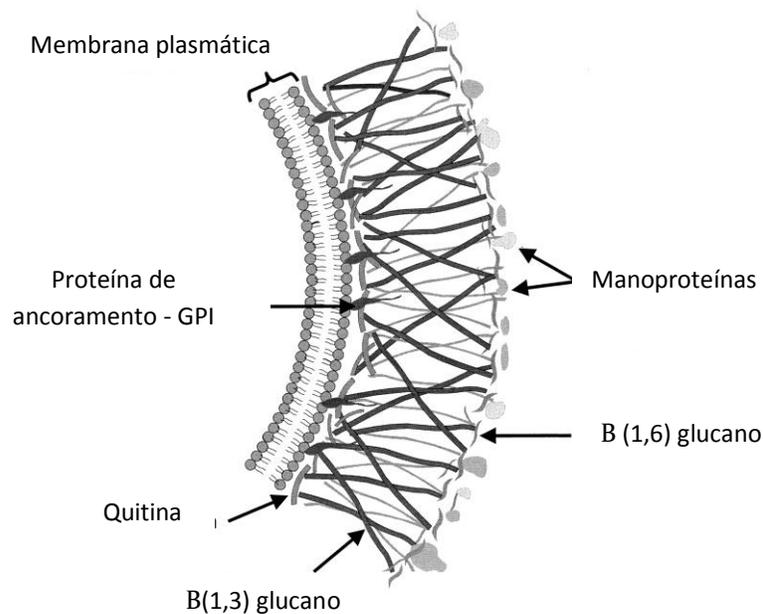
Os fungos podem atuar como saprófitas, parasitas ou realizar relações mutualísticas. Na atuação saprófita o fungo atua degradando organismos mortos. Na parasítica, o fungo consome substâncias e estruturas de organismos vivos, prejudicando o hospedeiro, podendo resultar em, alguns casos, em morte destes. Na relação mutualística, o fungo se associa com outros organismos, porém nesse caso, ambos se beneficiam com essa relação. Um exemplo de relação mutualística são as micorrizas, simbiose entre plantas e fungos, em que o fungo auxilia a planta a absorver minerais e água do solo, em contrapartida, a planta fornece nutrientes necessários para o desenvolvimento do fungo (PEREIRA *et al.* 1996). Vale salientar que, em todos os casos, os fungos promovem a liberação de enzimas digestivas para o exterior, onde irão degradar os macronutrientes, para em seguida absorverem os micronutrientes resultantes da ação de degradação.

Para o homem, os fungos também são úteis, em especial no que concerne a alimentação. Os fungos são utilizados há cerca de 4000 anos a.C., na produção de cerveja e pão, por meio do processo de fermentação e *in nature* com o uso de cogumelos (CARVALHO *et al.*, 2006). Outros alimentos como queijo gorgonzola, roquefort e camembert, e o vinho também são produzidos com a utilização de

fungos (SBAMPATO *et al.*, 2000). Industrialmente tem-se utilizado fungos para obtenção de produtos de interesse, tais como: etanol, ácido cítrico, ácido glucônico, vitaminas e antibióticos. Nesse último caso, vale enfatizar a grande descoberta realizada por Alexander Fleming, em 1928 - a penicilina, a partir de culturas do fungo *Penicillium chrysogenum*.

## 1.2- CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS E ESTRUTURAS DOS FUNGOS

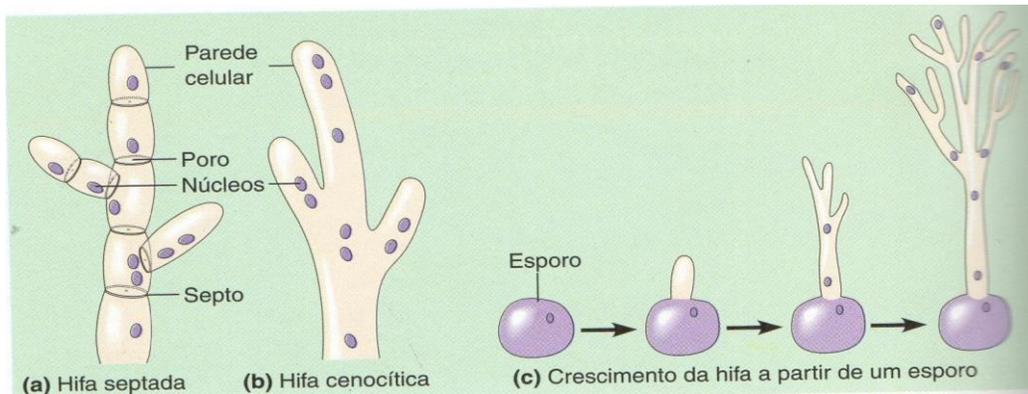
Os fungos são seres eucarióticos e em sua maioria são categorizados como quimio-heterotrófico, obtendo assim, energia a partir da degradação de moléculas oriundas do meio externo. Os fungos são capazes de originar um novo organismo a partir de um pequeno fragmento estrutural. Similarmente aos vegetais, os fungos possuem parede celular, diferindo em sua composição, uma vez que, as paredes fúngicas são ricas em glicanas, mananas e quitina, e as vegetais em celulose e pectina (Figura 1) (TORTORA *et al.*, 2005).



**Figura 1** – Estrutura da parede e membrana fúngica

Fonte: SELITRENNIKOFF, 2001.

Estruturalmente os fungos são divididos em filamentosos e leveduras. Os fungos filamentosos se desenvolvem formando filamentos também denominados de hifas, que podem ser septadas ou não (Figura 2). O septo serve para promover a individualização das células que compõem as hifas, e desse modo, no segmento intermediário de dois septos têm-se uma célula e conseqüentemente um núcleo. Apesar da presença do septo, a individualização não ocorre completamente, pois estes apresentam poros interligando o citoplasma de uma célula a outra. Em se tratando de hifas cenocíticas, essas são visualizadas como uma estrutura contínua composta por vários núcleos. O crescimento da hifa ocorre por alongamento de suas extremidades (TORTORA *et al.*, 2002).



**Figura 2** – Diferenciação estrutural das hifas septadas e cenocíticas, e o desenvolvimento de um organismo a partir de um propágulo.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

Funcionalmente as hifas podem ser divididas em vegetativas ou elementos de reprodução (Figura 3). A hifa vegetativa possui a função de promover a captação de nutrientes necessários para o desenvolvimento da colônia. Os elementos de reprodução possuem a função de desenvolver as estruturas de reprodução da colônia, os esporos sexuais e assexuais. O estudo dos esporos é fundamental para a correta identificação da espécie. Em geral, as hifas reprodutivas são aéreas enquanto que as hifas de sustentação são terrestres, e em muitos casos penetram abaixo da superfície para captar nutrientes. Em condições ideais de desenvolvimento, as hifas podem formar uma grande rede

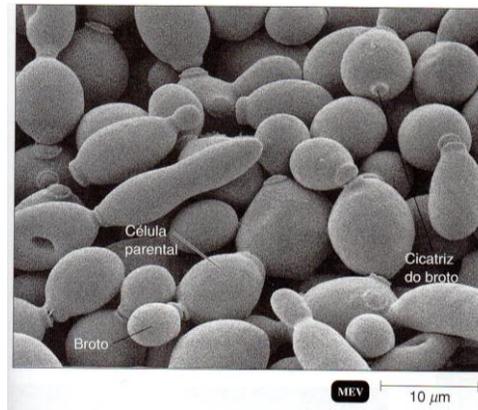
interconectada fibrosa denominada micélio, que são visíveis a olho nu na natureza.



**Figura 3** – Elementos de reprodução e hifas vegetativas de *Aspergillus niger*, cultivado em placa de Petri.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

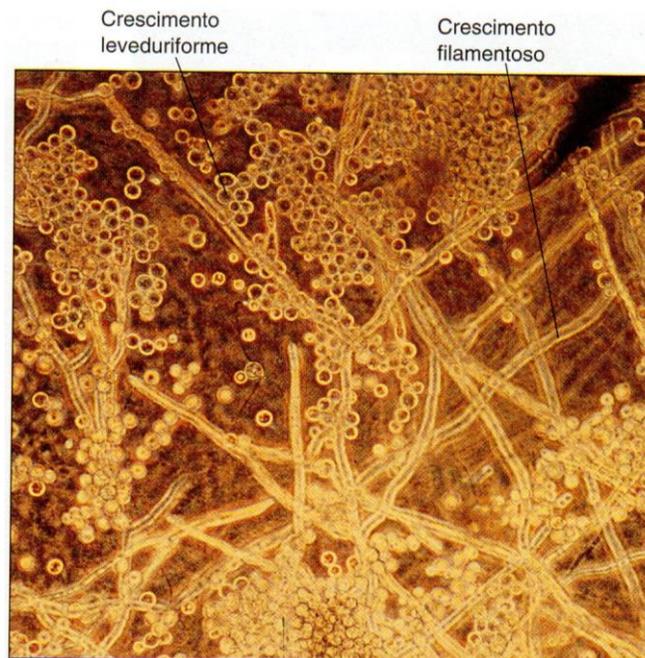
Estruturalmente as leveduras apresentam uma organização muito mais simples, sendo unicelular, esféricas ou ovais, o que confere maior velocidade de proliferação em comparação aos fungos filamentosos (TORTORA *et al.*, 2005). Uma das formas das leveduras se desenvolverem é por brotamento ou gemulação. O processo inicia-se com uma célula parental formando uma protuberância (broto) na sua superfície. Enquanto que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide originando a formação de dois núcleos, sendo que um deles migra para o broto em formação. Por fim, o material da parede celular é produzido e o broto se separa da célula parental formando outra célula, deixando uma cicatriz externa na célula parental (Figura 4).



**Figura 4** – Proliferação por brotamento.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

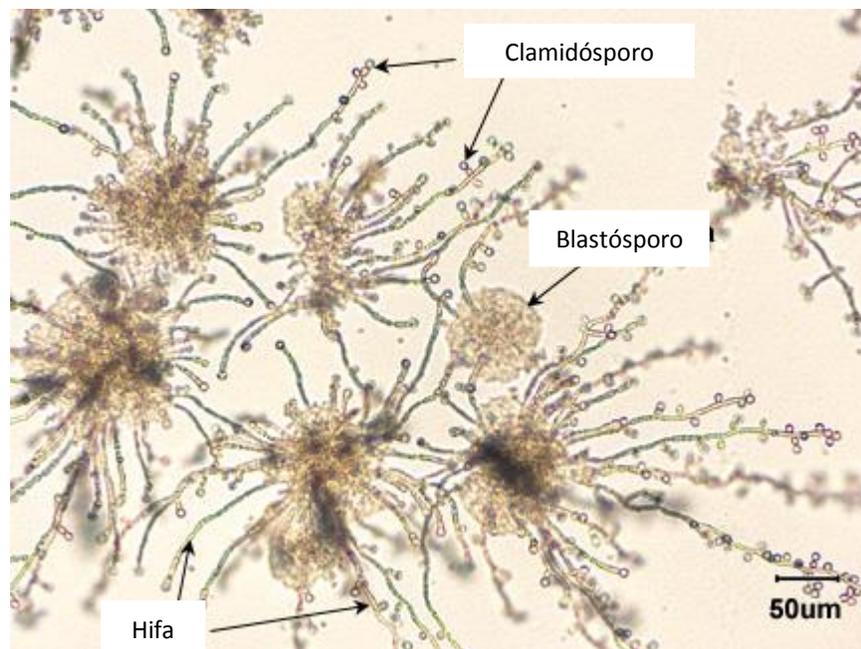
Uma importante propriedade de alguns fungos é o fato que podem se desenvolver em forma de levedura e forma filamentosa, devido principalmente as condições ambientais (Figura 5).



**Figura 5** – Crescimento na forma de levedura e na forma filamentosso, comuns em *Candida ssp.*

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

As leveduras também se proliferam através de esporos assexuais do tipo blastósporo e clamidósporo (Figura 6). O blastósporo é produzido a partir de um broto oriundo de uma célula parental. Essa estrutura é produzida por *Candida* ssp. e *Cryptococcus* ssp. O clamidósporo diferencia-se principalmente pela espessura da parede celular. Além disso, as leveduras podem desenvolver pseudo-hifas, a partir de brotamentos em cadeia que não se desprendem da célula parental. Essa estrutura auxilia na aderência às superfícies, permitindo que o fungo atinja e se fixe em tecidos abaixo da epiderme (CATE *et al.*, 2009).



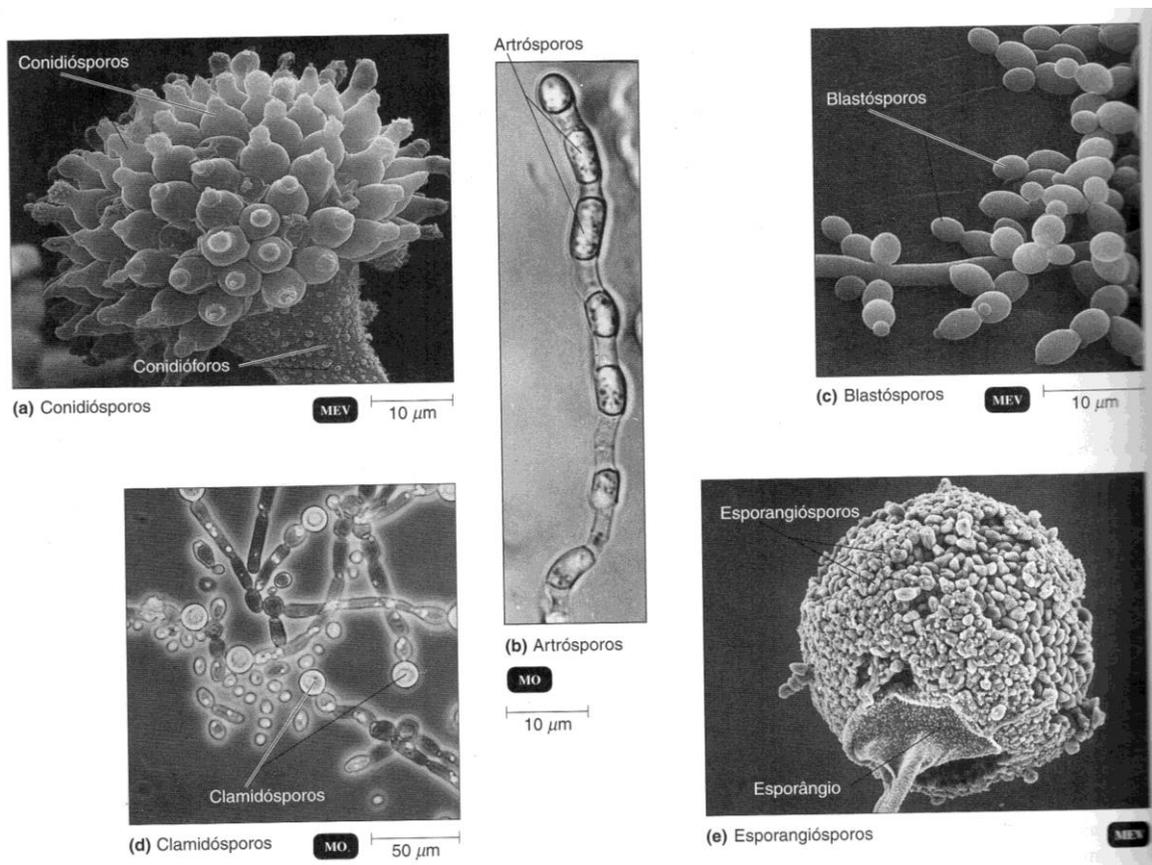
**Figura 6** – Blastósporos e clamidósporos de *Candida albicans*.

Fonte: KAISER, 2013.

As leveduras são normalmente seres aeróbios que em determinadas circunstâncias são capazes de viver em aneroiose facultativo. Utilizando a via anaeróbica, ocorre o processo de fermentação dos hidratos de carbono, o que resulta na formação do etanol e dióxido de carbono, produtos muito utilizados na obtenção de bebidas e crescimento de pães (TORTORA *et al.*, 2002).

### 1.3- CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS QUANTO A ESTRUTURA DE REPRODUÇÃO

Os fungos de importância clínica são fungos terrestres, ou seja, não apresentam estruturas móveis como flagelos. Os fungos terrestres são classificados em quatro filos: Zigomycota, Ascomycota, Basidiomycota e fungos imperfeitos. Essa classificação é dada pela presença de reprodução sexual e o tipo de estrutura que origina os esporos sexuais, assexuais (Figura 7) e os seus ciclos de vida (TORTORA *et al.*, 2002).

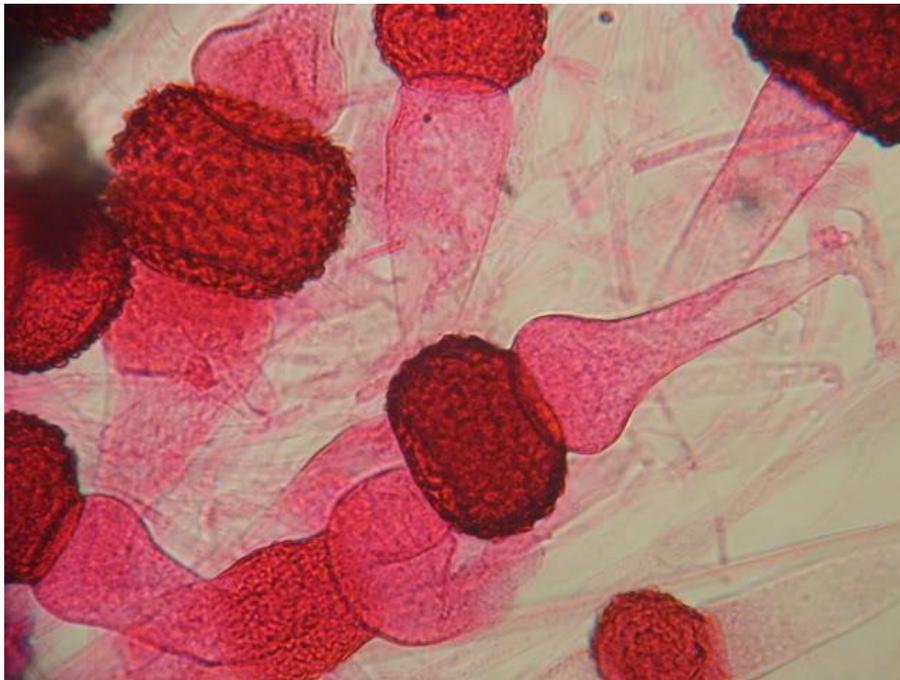


**Figura 7** – Tipos de esporos assexuais produzidos por fungos

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

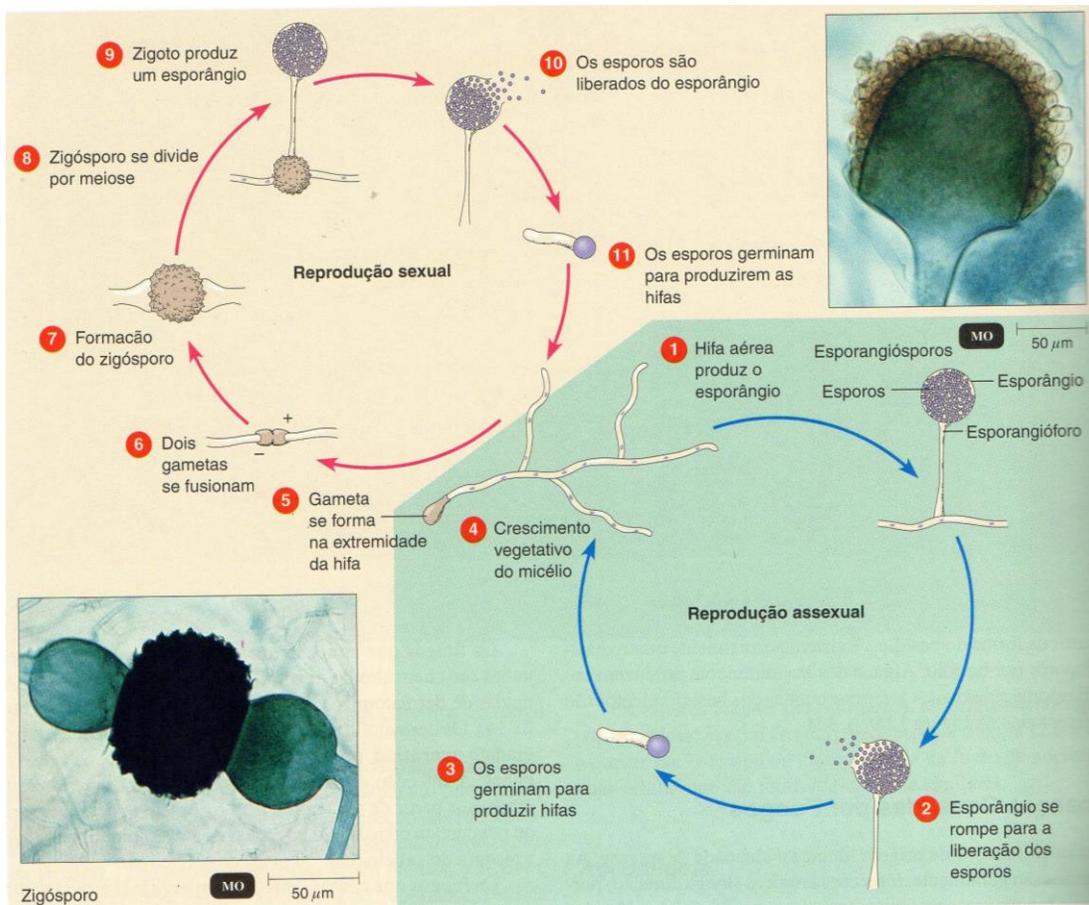
### 1.3-1. ZIGOMYCOTA

O filo Zigomycota abriga os fungos conhecidos como zigomicetos que apresentam mais de 600 espécies descritas. Os esporos sexuais destes fungos são produzidos através da fusão de hifas diferentes (+) e (-) que origina a formação do zigósporo (Figura 8), que posteriormente se divide por meiose, formando os esporos sexuais. Outra característica comum dos fungos desse filo é que suas hifas são cenocíticas. Os esporos assexuais são produzidos por meio de hifas que se desenvolvem e se diferenciam originando a formação do esporângio (Figura 9). Neste filo são encontrados principalmente fungos filamentosos saprofíticos, que vivem no solo em decomposição da matéria orgânica animal e (ou) vegetal. Alguns representantes desse filo são parasitas de plantas e animais (TORTORA *et al.*, 2002).



**Figura 8** – Zigósporo, estrutura de reprodução sexuada encontrada nos Zigomicetos.

Fonte: photobucket (em: 20/05/2013).



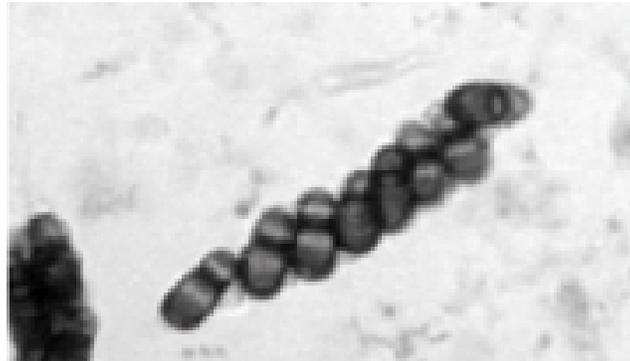
**Figura 9** – Ciclo de vida de *Rhizopus*, um zigomiceto.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

### 1.3-2. ASCOMICOTA

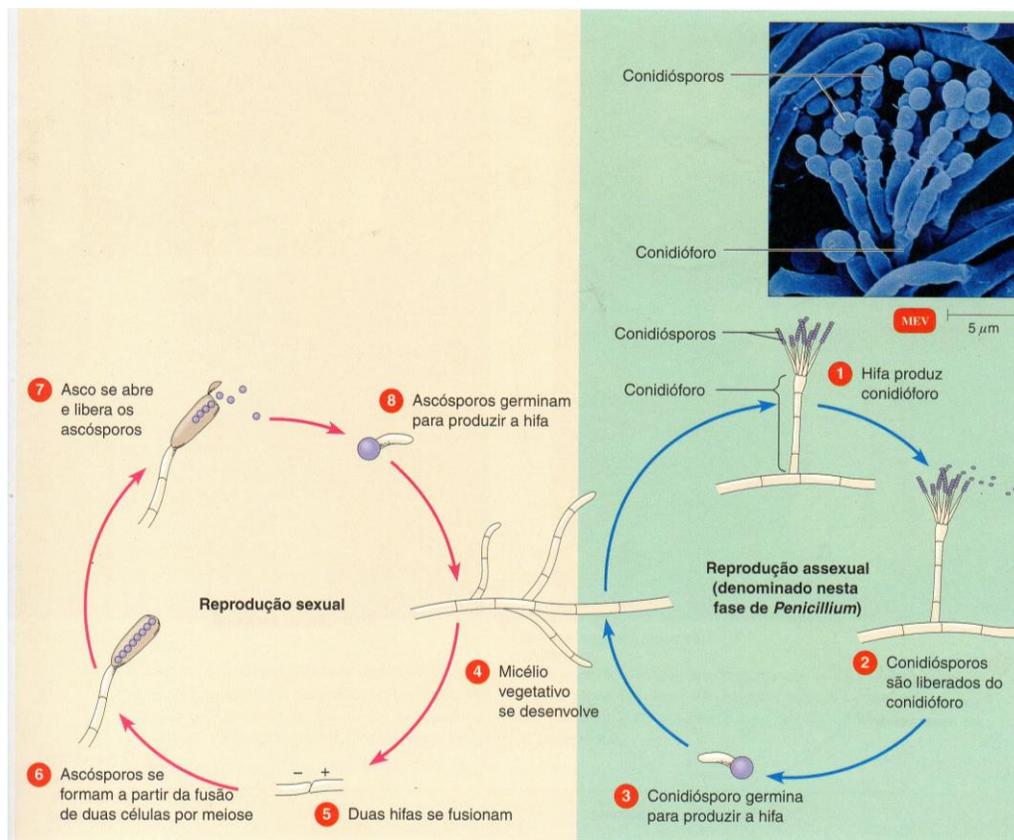
Mais de 30 000 espécies de fungos pertencem ao filo Ascomycota. O prefixo “asco” tem origem na estrutura formada na produção dos esporos sexuais - denominado asco. O asco assemelha-se a um saco contendo em seu interior os esporos sexuais denominados ascósporos (Figura 10). Essa estrutura é formada por meio da fusão de duas hifas, originando uma hifa dicariótica, que sofrerá meiose originando os ascósporos (Figura 11). Na reprodução assexuada da maioria dos ascomicetos ocorre a formação dos esporos denominados conídios, que são originados da diferenciação da extremidade de algumas hifas denominadas de conidióforos (Figura 11). No filo Ascomycota se encontram

fungos filamentosos com hifa septada e algumas leveduras (TORTORA *et al.*, 2002).



**Figura 10** – Asco com oito ascósporos.

Fonte: JÚNIOR; PFENNING, 2006.



**Figura 11** – Ciclo de vida do *Eupenicillium* spp., um ascomiceto.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

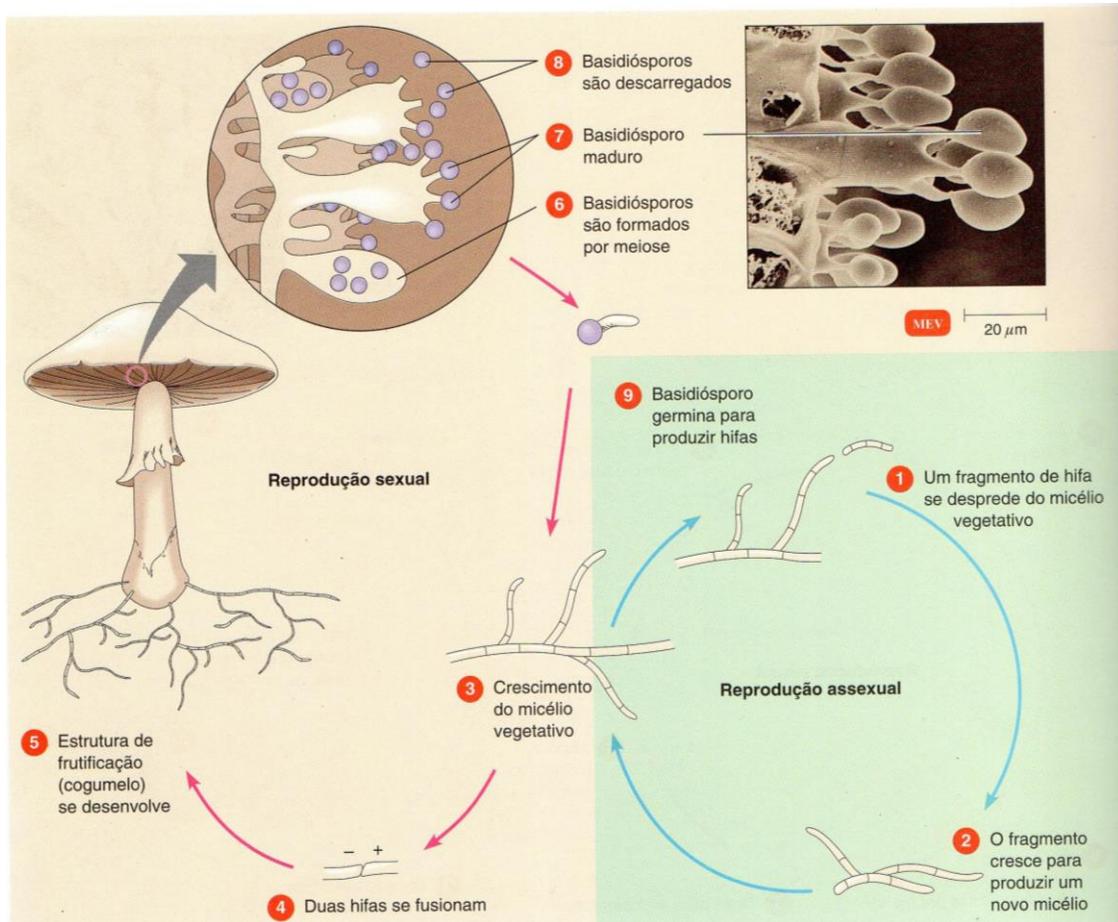
### 1.3-3. BASIDIOMYCOTA

O filo Basidiomycota é formado por mais de 25 000 espécies de fungos. Os esporos sexuais são formados dentro da estrutura denominada basídio que contém em seu interior os basidiósporos, que são os esporos sexuais. O corpo vegetativo dos basidiomicetos são subterrâneo e são responsáveis por captar os nutrientes do solo. Algumas hifas se projetam para a superfície criando uma massa compacta chamada de botões ou basidiocarpo (Figura 12). Os cogumelos utilizados na culinária correspondem a estes botões. Na porção inferior destes botões são encontrados os basídios (Figura 13). Basidiomicota apresentam hifas septadas assim como aos encontrados no filo Ascomycota (TORTORA *et al.*, 2002).



**Figura 12** – Estrutura do basidiocarpo de *Amanita muscaria*

Fonte: <http://esteticadental.files.wordpress.com/2008/01/cogumelos.jpg> (em: 19/05/2013)



**Figura 13** – Ciclo de vida genérico de um basidiomicota

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002.

#### 1.3-4. FUNGOS IMPERFEITOS

Atualmente existem mais de 25 000 espécies de fungos pertencentes a esse filo. Quando os fungos ainda não evidenciaram a formação de esporos sexuais são classificados como fungos pertencentes ao filo Deuteromicota, conhecidos também como fungos imperfeitos. Os esporos assexuais que são encontrados nesse filo são: clamidósporos, artrósporos e conidiósporos (TORTORA *et al.*, 2002).

### 1.3-5. DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS

Algumas espécies de fungos possuem a sua relevância na medicina pelos danos causados na saúde em humanos. Na tabela 1, encontramos a distribuição de alguns fungos patogênicos humanos em relação ao filo.

**Tabela 1** – Divisão de alguns fungos patogênicos humanos segundo o filo

Divisão (Filo)	Característica de crescimento	Tipos de esporos assexuais	Patógenos humanos
Zigomycota	Hifa não septada	Esporangiósporos	<i>Rhizopus</i> ssp., <i>Mucor</i> ssp.
Ascomycota	Dimórfico	Conidiósporos	<i>Aspergillus</i> ssp. , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Sporothrix schenckii</i>
Basidiomycota	Hifa septada, leveduras encapsuladas	Conidiósporos	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Fungos imperfeitos	Hifa septada	Conidiósporos	<i>Epidermophyton</i> ssp.
	Dimórfico	Artrósporos	<i>Coccidioides immitis</i>
	Leveduriforme, pseudo-hifa	Clamidósporos	<i>Candida albicans</i>

Fonte: TORTORA *et al.*, 2002, com modificações.

### 1.4- RELAÇÃO ENTRE OS FUNGOS E O HOMEM

Além das utilidades dos fungos na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas e aplicações industriais e comerciais, esses exercem importante papel na saúde da população. Os fungos integram a microbiota residente da epiderme e mucosas de humanos onde exercem importante papel na manutenção do equilíbrio (MIKELSAAR, 2011). Essa relação é pacífica, porém os fungos são capazes de gerar infecções denominadas genericamente micoses. As micoses são responsáveis por grandes agravos à saúde, podendo nos casos mais graves levar a morte (BURLAUD *et al.*, 2010). Tais infecções acometem principalmente pessoas que apresentam o seu sistema imunológico deprimido, em especial portadores da Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIDA), transplantados e pacientes submetidos à quimioterapia (VAZQUEZ, 2000; PAYA, 2000). Observa-

se mundialmente um aumento na ocorrência de casos das micoses, tornando-se um grave problema de saúde pública (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Além do aumento no número de infecções, tem-se o incremento das cepas resistentes aos recursos farmacoterapêuticos existentes, o que agrava o quadro existente (CANUTO; RODERO, 2002; MATTA *et al.*, 2007; DAWSON *et al.*, 2012).

Além das micoses alguns fungos produzem toxinas denominadas micotoxinas, que podem gerar malefícios à saúde humana e levar a óbito (TANIWAKI *et al.*, 2009). A principal fonte de exposição é a ingestão das toxinas por meio de alimentos contaminados, especialmente derivados do milho, trigo, cevada e amendoim. Um exemplo de contaminação é a ingestão de cereais a base de trigo, contaminados com alcaloide de *Ergot*, produzidas pelo fungo *Claviceps purpurea* (SCHARDL *et al.*, 2006). Em amendoins contaminados pelo fungo *Aspergillus flavus* encontramos a aflatoxina, que promove a destruição das células parenquimatosas dos hepatócitos, causam hemorragias e alterações nas funções nervosas, além de possuir potencial carcinogênico (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). As ocratoxinas são toxinas produzidas por espécies de *Aspergillus*, que levam ao acúmulo de gordura hepática, além de promoverem nefrotoxicidade. Espécies de fungos do gênero *Fusarium* produzem tricotecenos que provocam êmese, hemorragias, necrose da epiderme e interferência no sistema imunológico.

#### 1.5- INFECÇÕES CAUSADAS PELOS FUNGOS ESTUDADOS NESSE TRABALHO

Neste trabalho foram estudados isolados clínicos e cepas padrão ATCC – *American Type Culture Collection* de fungos responsáveis por gerar as infecções denominadas candidíase, criptococose e dermatofitoses.

### 1.5-1. CANDIDÍASE

Candidíase é causada por espécies de leveduras do gênero *Candida*, sendo uma infecção tipicamente oportunista (PALACIO *et al.*, 2009). Algumas espécies de *Candida* são encontradas comumente em tecido humano especialmente nas mucosas vaginal e orofaríngea, sendo parte integrante da microbiota residente (MOYES; NAGLIK, 2011). O equilíbrio dessa microbiota é promovido principalmente pela microbiota bacteriana que é capaz de regular o crescimento de fungos. Normalmente as leveduras se desenvolvem por fatores que promovem o desequilíbrio dessa relação, tais como: uso de antibacterianos, alterações no pH de mucosas, distúrbios imunológicos, uso de contraceptivos orais, período gestacional, uso de quimioterápicos e diabetes descompensado (KRUTMANN, 2009).

Estudos afirmam que cerca de 30% das pessoas saudáveis terão algum episódio de candidíase ao longo da vida, valor esse ainda maior em grupo de pessoas mais susceptíveis (BROWN, 2011). Dados estimam que 30 a 50% da população apresenta *Candida albicans* como componente da microbiota residente, sendo esta espécie a principal responsável pela candidíase, respondendo de 40 a 60% dos casos (RODLOFF *et al.*, 2011). Outras espécies também são responsáveis por ocasionar candidíase como: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. rugosa* e *C. guilliermondii*. Essas espécies são reunidas em um grande grupo denominado *Candida não-albicans*. Atualmente é observada a expansão de infecções promovidas por espécies de *Candida não-albicans*, especialmente *C. tropicalis* e *C. glabrata* (CHI *et al.*, 2011; GIANNINI; KISHORE, 2011).

Quando o microrganismo chega a corrente sanguínea, pode causar uma grave infecção que em 40% dos casos leva ao óbito. As espécies de *Candida* ocupam o 4<sup>a</sup> lugar em microrganismos isolados em cultura de sangue, sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (MUÑOZ *et al.*, 2010). Dados de candidemia evidenciam a franca expansão no número de casos, onde em 1985

tinha-se 1,6 casos/ 100.000 habitantes passando para 12,5 casos em 2006 (RODRIGUEZ-CREIXEMS *et al.*, 2008).

### 1.5-2. CRIPTOCOCOSE

Assim como a candidíase a criptococose é uma infecção oportunística. Os agentes etiológicos da criptococose são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, sendo ambas leveduras encapsuladas que se dividem por brotamento (MOREIRA *et al.*, 2006). As infecções promovidas por *C. gattii* são menos frequentes do que as promovidas por *C. neoformans* (BYRNES *et al.*, 2011). Esses fungos se desenvolvem com facilidade em fezes de aves, caracterizando assim uma doença tipicamente urbana, devido a grande concentração de aves, especialmente pombos, nos grandes centros urbanos. O contágio ocorre principalmente pela inalação de esporos dos agentes etiológicos carregados pelo ar. Inicialmente ocorre uma infecção pulmonar, que através do sangue pode se espalhar para outros tecidos, em especial para as meninges podendo gerar meningite, que é a forma mais grave de infecção, e em muitos casos fatal (SLOAN *et al.*, 2008; TANEJA *et al.*, 2008). Outra forma de exposição é a penetração de esporos por intermédio de lesões presentes na pele. A incidência da criptococose é maior em pacientes imunossuprimidos, em especial pacientes HIV positivos (DA SILVA *et al.*, 2011). Essa informação é bastante útil clinicamente, uma vez que, muitos pacientes ainda não diagnosticados como HIV positivos desenvolvem a criptococose e posteriormente tem a sua sorologia positiva confirmada, servindo em muitos casos como diagnóstico diferencial (MACDOUGALL *et al.*, 2011).

### 1.5-3. DERMATOFITOSE

As micoses superficiais são infecções que acometem a epiderme, o cabelo e as unhas. Dentre as micoses superficiais temos as dermatofitoses. As dermatofitoses são infecções promovidas por um grupo específico de fungos

denominados dermatófitos. Os dermatófitos são fungos filamentosos pertencentes a três gêneros específicos: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (TORTORA *et al.*, 2005). Os dermatófitos são fungos queratinofílicos, ou seja, possuem afeição por tecidos queratinizados, como a pele, unhas e pêlos, sendo capazes de degradar a queratina, através da produção de queratinases, e utilizar os produtos de degradação como fonte de nutriente (MONOD, 2008). Mais de 40 espécies de dermatófitos são causadores de infecções de pele, contudo, a maioria das infecções é causada por poucas espécies (DAWSON *et al.*, 2012). Dentre elas vale salientar as espécies *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis* e *E. floccosum* (WILLE *et al.*, 2009).

Popularmente as dermatofitoses são conhecidas como “tineas”, sendo diferenciadas entre si segundo a região corpórea atingida, como por exemplo: a *Tinea capitis* é a tinha que ocorre no couro cabeludo, adquirida através de animais domésticos ou de pessoas infectadas, e em casos mais graves pode gerar placas de alopecia no couro cabeludo; *Tinea cruris* ocorre no tecido cutâneo das regiões inguinais; *Tinha pedis* ocorre nos pés, e é conhecida popularmente como pé-de-atleta (DEGREEF, 2008). As dermatofitoses são infecções superficiais que normalmente ficam restritas a epiderme e em raros casos são capazes de atingir a derme, não sendo capazes de desenvolver infecções invasivas sistêmicas (MOLINA, 2011). Esteticamente as dermatofitoses tem um apelo visual muito forte e possuem grande importância na prática clínica, uma vez que, apesar da infecção não evoluir para uma infecção sistêmica o dano tecidual pode ser porta de entrada para outros micro-organismos.

A distribuição dos tipos de tineas não segue um padrão único em todo mundo, uma vez que, existe uma estreita relação entre os tipos de tineas e as condições socioeconômicas e climáticas, e hábitos culturais (KOKSAL *et al.*, 2009). Alguns fatores favorecem o surgimento de determinadas dermatofitoses, como por exemplo, para a *Tinea capitis*, que atinge o couro cabeludo. Estudos têm demonstrado que o uso coletivo de pentes e escovas, uso de trançados no cabelo do tipo “rastafári” e a utilização de óleos no couro cabeludo são fatores que

favorecem seu surgimento, pois promovem a disseminação/contaminação, exposição/dano ao couro cabeludo e fixação dos fungos ao couro cabeludo, respectivamente (NEJI *et al.*, 2009; GINTER-HANSELMAYER *et al.*, 2007). A recorrência de tinhas não é um fenômeno raro, assim como a sua disseminação para outras áreas do corpo (BORGERS *et al.*, 2005). Isso ocorre principalmente pela presença de reservatórios no próprio corpo e portadores assintomáticos. Exemplificando essa relação, é comum a pessoa com a presença de *Tinha capitis* também apresentar *Tinea unguium* (unhas) e/ou *Tinea corporis* (difusa no corpo) (HAVLICKOVA *et al.*, 2008).

#### 1.6- FATORES PREDISPOANTES PARA MICOSES

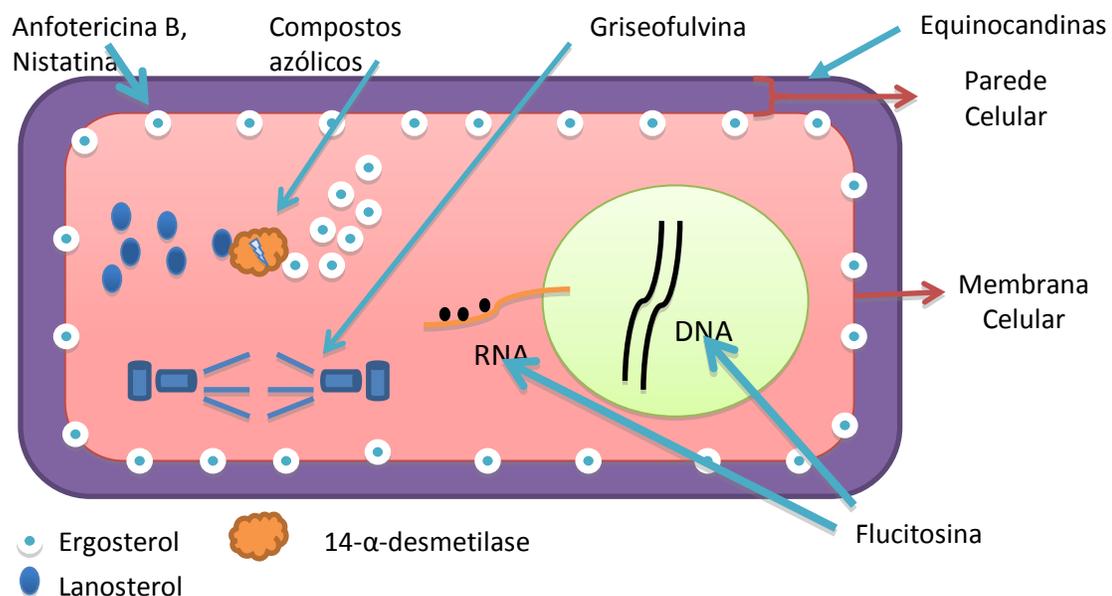
As micoses apresentam uma maior incidência em grupos de pessoas imunossuprimidas como HIV positivos, transplantados e pessoas em quimioterapia (AMERSON; MAURER, 2010; BADIEE *et al.*, 2011). O desenvolvimento dos fungos é facilitado em pessoas com o sistema imunológico debilitado, ou em quadros neutropênicos. A neutropenia leva a diminuição das células de defesa assim como a produção das interleucinas 17 e 22 fundamentais no combate as infecções fúngicas (SEGAL *et al.*, 2002). Algumas alterações genéticas nos receptores manose, dectina-1 e dectina-2 comprometem a capacidade do sistema imunológico em reconhecer componentes da parede fúngica, dificultando assim o combate aos fungos (VAN DER MEER *et al.*, 2010).

Em pacientes diabéticos ocorre a elevação dos níveis de glicose nos tecidos favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos (DENNERSTEIN; ELLIS, 2001). Em mulheres grávidas e em uso de anticoncepcionais é observado um maior número de casos de micoses na região genital, devido aos efeitos dos estrogênios nos tecidos, que promove aumento dos níveis de glicose, e assim condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos (SOBEL, 2007). Outros fatores ligados à higiene são importantes para a contaminação por fungos

como a partilha de roupas íntimas, pentes e piscinas coletivas (SEEBACHER *et al.*, 2008).

## 1.7- TRATAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO DAS MICOSES

O tratamento das infecções fúngicas é realizado com a utilização de agentes antifúngicos que interagem com componentes estruturais e metabólicos dos fungos (Figura 14). Tais agentes podem ser divididos em dois grandes grupos: os antibióticos antifúngicos como os polienos e as equinocandinas, e os fármacos sintéticos como os compostos azólicos e as pirimidinas fluoradas.



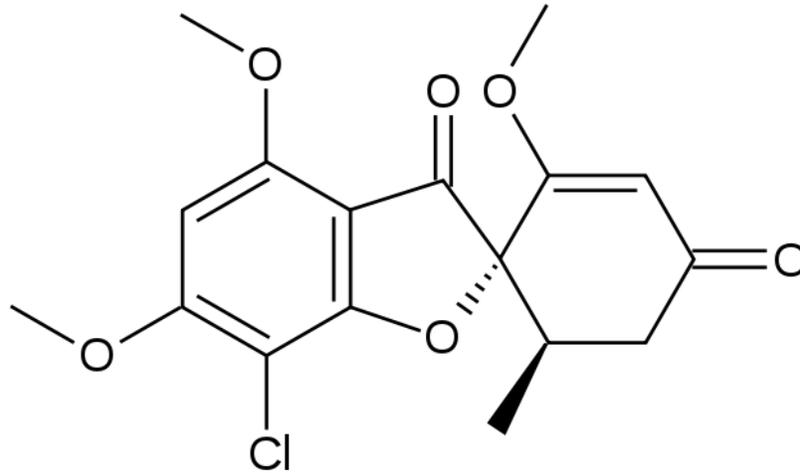
**Figura 14** – Alvos celulares dos agentes antifúngicos.

### 1.7-1. ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS

#### 1.7-1.1. ANFOTERICINA B



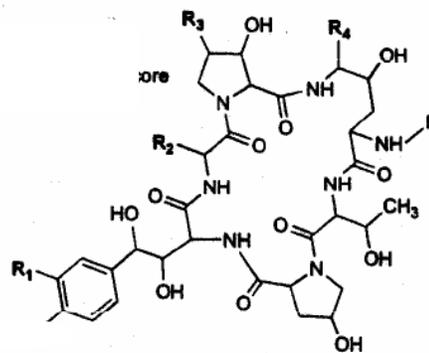




Griseofulvina

#### 1.7-1.4. EQUINOCANDINAS

As equinocandinas são formadas por um anel de seis aminoácidos ligados a uma longa cadeia lipofílica. Todos os compostos pertencentes ao grupo das equinocandinas possuem como base a estrutura da equinocandina B que é encontrada em *Aspergillus nidulans*. Conforme a variação dos radicais ligados à estrutura base são formados os agentes terapêuticos desta classe (Figura 15). As equinocandinas agem inibindo a enzima (1,3)  $\beta$ -glucano sintase resultando na diminuição dos níveis de (1,3)-glucano, um polímero de glicose que possui a função de estabilizar a parede fúngica e a sua falta resulta na perda da integridade celular (SUCHER *et al.*, 2009).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Pneumocandina B	H	NH <sub>2</sub> (CO)CH <sub>2</sub> CHOH	H	OH	
Caspofungina	H	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHOH	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	
Equinocandina B	H	CH <sub>3</sub> CHOH	CH <sub>3</sub>	OH	
Anidulafungina	H	CH <sub>3</sub> CHOH	CH <sub>3</sub>	OH	
FR901379	HOSO <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub> (CO)CH <sub>2</sub> CHOH	CH <sub>3</sub>	OH	
Micafungina	HOSO <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub> (CO)CH <sub>2</sub> CHOH	CH <sub>3</sub>	OH	

**Figura 15** - Estrutura química dos antibióticos pneumocandina B e equinocandina B e dos seus derivados caspofungina, anidulafungina e micafungina.

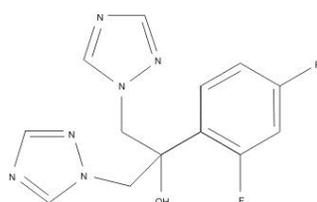
Fonte: BERGOLD, 2004

## 1.7-2. AGENTES ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS

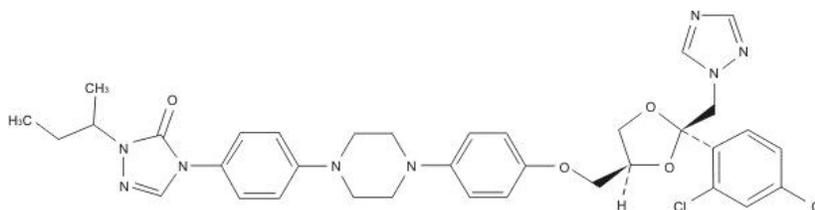
### 1.7-2.1. COMPOSTOS AZÓLICOS

Os compostos azólicos são divididos em duas classes: imidazólicos e triazólicos. Os compostos imidazólicos comercializados são: clotrimazol, miconazol, cetoconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol e sulconazol, e os triazólicos são: terconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e fluconazol

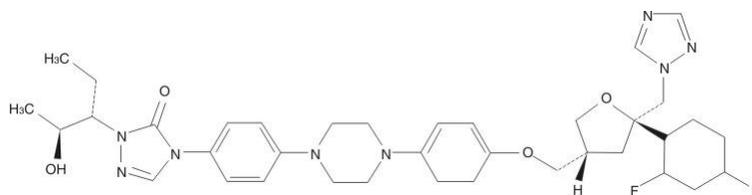
(HAMDAN; HAHN, 2006). O mecanismo de ação desses compostos é através da inibição da enzima 3A do citocromo P450, lanosterina 14- $\alpha$ -demetilase, enzima que converte o lanosterol em ergosterol, principal constituinte da membrana celular do fungo (ZONIOS; BENNETT, 2008). Por conseguinte desestabiliza a produção do ergosterol da membrana citoplasmática do fungo, e promove o acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis que comprometem enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo assim o crescimento de fungos, culminando com a inibição da replicação. Devido à similaridade da via de biossíntese de esteróides humanos com a de fungos, o uso de compostos azólicos comprometem a produção de esteróides humano. Desse modo são observadas anormalidades endócrinas, dentre elas irregularidades menstruais, ginecomastia, diminuição da libido e azoospermia transitória. Outros efeitos adversos como hepatotoxicidade, náusea, vômito, hipertrigliceremia e hipopotassemia também são encontrados. Os compostos triazólicos são metabolizados mais lentamente e causam menos efeitos na síntese de esteróides humanos. Outro fator que deve ser levado em consideração na administração de compostos azólicos é que alguns, em especial o itraconazol, interagem com vários fármacos das mais diversas classes farmacológicas (KOKIL; BHATIA, 2009).



Fluconazol



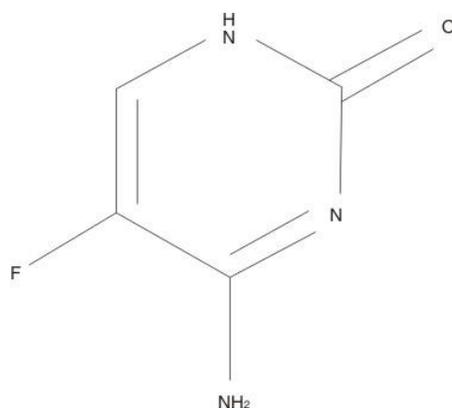
Cetoconazol



Itraconazol

### 1.7-2.2. FLUCITOSINA

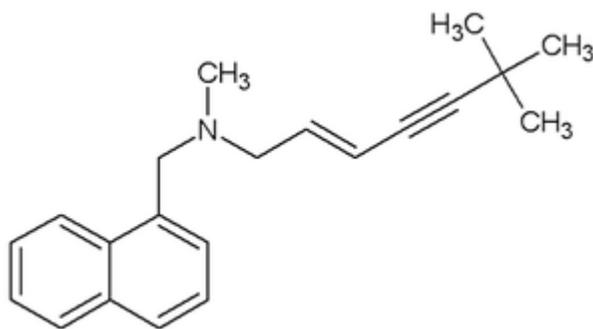
A flucitosina é uma pirimidina fluorada utilizada principalmente para o tratamento de infecções por *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. Para agir, a flucitosina necessita de enzimas dos fungos, primeiramente o composto é desaminado formando o composto 5-fluorouracil, o qual é convertido em ácido 5-fluorouridílico, que pode ser incorporado no RNA prejudicando a síntese de proteínas ou pode ser metabolizado a ácido 5-fluorodesoxiuridílico, que inibe a enzima timidilato sintetase prejudicando a síntese de DNA do fungo (WALDORF; POLAK, 1983). Os seres humanos não são capazes de metabolizar flucitosina em 5-fluorouracil (SONG; DERESINSKI, 2005). A flucitosina é bem absorvida por via oral e se distribui por vários tecidos, podendo ocorrer efeitos adversos como leucopenia, trombocitopenia, exantema, náuseas, hepatotoxicidade, vômitos e diarreia (GILMAN, 2003).



Flucitosina

### 1.7-2.3. TERBINAFINA

A terbinafina é um fármaco fungicida com elevada lipossolubilidade. Esta alilamina sintética possui ação principalmente sobre micoses de unhas causadas por dermatófitos. O mecanismo de ação é a inibição seletiva da enzima esqualeno epoxidase fúngica, que está envolvida na síntese do ergosterol a partir do esqualeno, como resultado ocorre o acúmulo do esqualeno que é tóxico para a célula fúngica (NEWLAND; ABDEL-RAHMAN, 2009). O uso de terbinafina pode levar a hepatotoxicidade e neutropenia grave (GILMAN, 2003).



Terbinafina

### 1.8- PANORAMA DAS INFECÇÕES POR *CANDIDA*, *CRYPTOCOCCUS* E DERMATÓFITOS

Os agentes etiológicos de candidíase mudaram nos últimos anos, apesar de *C. albicans* continuar sendo o principal (70-80% dos casos) (VAZQUEZ; SOBEL, 2002). As infecções causadas por *Candida* não-*albicans* tem aumentado, especialmente por *C. tropicalis* (8% dos casos) e *C. glabrata* (5% dos casos) (GIANNINI; KISHORE, 2011). Vale salientar que esses valores variam conforme as regiões do mundo, assim como os hábitos populacionais. *C. guilliermondii* e *C. rugosa* são espécies relativamente atípicas, porém no Brasil, assim como em muitos países da América Latina a incidência dessas espécies tem aumentado consideravelmente sendo observado elevadas taxas de resistência a nistatina e

suscetibilidade reduzida a fluconazol e anfotericina B (COLOMBO *et al.*, 2003). A incidência de recidivas de candidíase tem aumentado especialmente em pacientes imunossuprimidos. O quadro de candidíase é agravado quando se avalia o perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos disponíveis, onde se observa um aumento na resistência fúngica, especialmente aos compostos azólicos (BADIEE *et al.*, 2010).

A sepse é a principal causa de morte em unidade de terapia intensiva (UTI) em todo o mundo, caracterizada por manifestações clínicas decorrente da invasão de organismos patogênicos ao homem, disseminado para a corrente sanguínea a partir de um sítio infeccioso. Em um estudo realizado em UTI de 75 hospitais de todas as regiões do Brasil, observou-se que 5,2% das sepse foram de origem fúngica (JUNIOR *et al.*, 2006). No ambiente hospitalar as lesões causadas por *Candida* correspondem a 80% dos casos de infecções causadas por fungos. Na corrente sanguínea essas infecções são denominadas candidemias, alcançando uma taxa de mortalidade de 40 a 60% dos casos o que representa elevada importância clínica (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A incidência da criptococose tem aumentado consideravelmente nos grandes centros urbanos atingindo principalmente pacientes imunossuprimidos. Em estudo realizado no Brasil envolvendo 215.000 pacientes HIV positivos entre os anos de 1980-2002 foi encontrada uma incidência de 6% de criptococose nesses pacientes, com 45 a 79% das ocorrências culminando em óbito do paciente (BRASIL, 2002).

Os agentes etiológicos das tinhas sofreram grandes modificações nos últimos anos. No período anterior aos anos 50 nos E. U. A. o principal agente etiológico das tinhas eram espécies do gênero *Microsporum*, sendo modificado o perfil a partir dos anos 50 com o aumento da incidência de *Trichophyton tonsurans* (GHANNOUM *et al.*, 2000). A elevação da incidência de *T. tonsurans* é um fenômeno de ocorrência mundial, porém alguns países como Áustria, Espanha, Itália, Grécia, Hungria, Alemanha e Holanda fogem a essa perspectiva uma vez

que, o principal agente causador das tinhas continua sendo o *M. canis*. A justificativa é que nestes países existe uma grande população de animais domésticos, em especial de gatos, que são os reservatórios naturais de *M. canis* (HAY *et al.*, 2001; FRANGOULIS *et al.*, 2004). Alguns estudos têm sugerido que a elevação nos casos de tinhas por *T. tonsurans* deve-se principalmente ao movimento migratório de imigrantes africanos e da América Central (AMEEN, 2010).

Associada à potencialidade de fungos gerarem danos ao homem, temos o fenômeno de resistência fúngica aos agentes terapêuticos. Desse modo ocorre o comprometimento do tratamento associado à elevação da mortalidade. Tal fenômeno é de ocorrência mundial (CANUTO; RODERO, 2002; MATTA *et al.*, 2007). No gênero *Candida* tem se encontrado espécies resistentes ao fluconazol e ao miconazol, em especial a espécie *Candida krusei* (ZARDO; MEZZARI, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2008). Também existem relatos de resistência de isolados clínicos da levedura *Cryptococcus neoformans* ao itraconazol e à anfotericina B (SILVA *et al.*, 2008). A resistência também ocorre em fungos filamentosos como espécies do gênero *Aspergillus* (CHAMILOS; KONTOYIANNIS, 2005; HOWARD *et al.*, 2006) e outros gêneros como *Pseudallescheria*, *Scopulariopsis* e *Fusarium* (WHITE *et al.*, 1998; CANUTO; RODERO, 2002).

#### 1.9- IMPORTÂNCIA DA PESQUISA COM PLANTAS

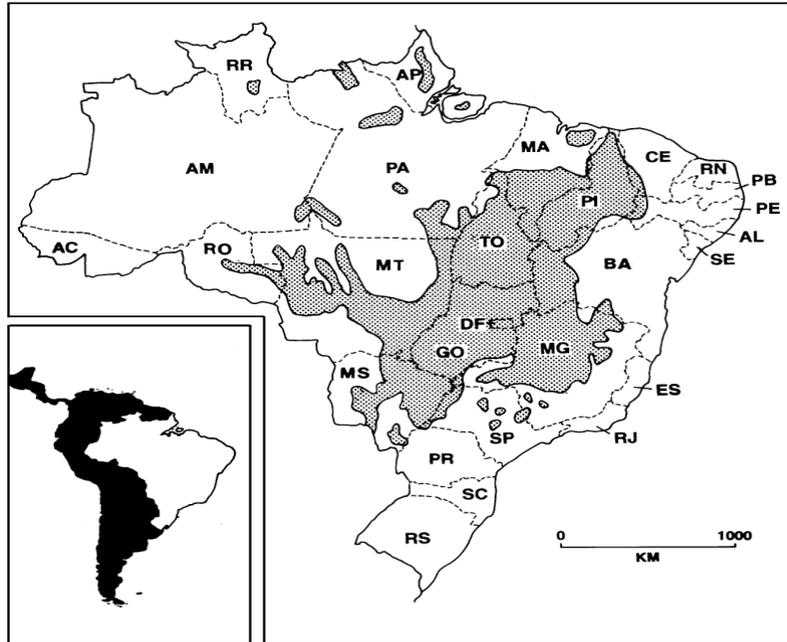
Em 2003, cerca de 50% das substâncias químicas utilizadas na terapêutica eram substâncias naturais, semi-sintetizados ou sintetizados a partir de grupos farmacofóricos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003). Atualmente, 26% das novas entidades aprovadas pelo Food and Drug Administration – FDA, são de origem natural (IBRAHIM *et al.*, 2013). A literatura relata inúmeros trabalhos que descobriram ou confirmaram propriedades farmacológicas de extratos e substâncias de plantas, entre elas a atividade antifúngica.

## 1.10- O BIOMA CERRADO

O Cerrado compreende uma área de 2 036 448 km<sup>2</sup> o que corresponde a 23,92% do território brasileiro (BRASIL, 2011). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil (Figura 16). Sua distribuição ocorre em várias regiões do Brasil, com preponderância de ocupação na região central (BRASIL, 1999; OLIVEIRA; MARQUIS, 2002). Os solos são geralmente profundos, bem drenados e com baixa disponibilidade de nutrientes e ricos em minerais como alumínio (HARIDASAN, 1982). O clima é sazonal com dois períodos bem definidos, os invernos secos e verões chuvosos.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente o Cerrado possui em sua composição mais de 11 000 espécies de plantas (BRASIL, 2013), sendo 4400 dessas espécies endêmicas, (MYERS et al., 2000). Em termos comparativos com Amazônia e Mata Atlântica, a diversidade biológica do Cerrado é pouco conhecida (BRASIL, 1999; MAURY, 2002).

Este bioma se caracteriza pela presença de árvores baixas, inclinadas, tortuosas, com ramificações irregulares e retorcidas, geralmente com evidências de queimadas. Os arbustos e subarbustos encontram-se espalhados, com algumas espécies apresentando órgãos subterrâneos perenes (xilopódios), que permitem a rebrota após a ocorrência de queimadas ou corte. Na época chuvosa os estratos subarbusivo e herbáceo tornam-se exuberantes devido ao seu rápido crescimento. Os troncos das plantas lenhosas em geral possuem cascas com cortiça grossa, fendida ou sulcada. As folhas em geral são rígidas e coriáceas. Essas características proporcionam ao Cerrado adaptabilidade às condições de seca (xeromorfismo).

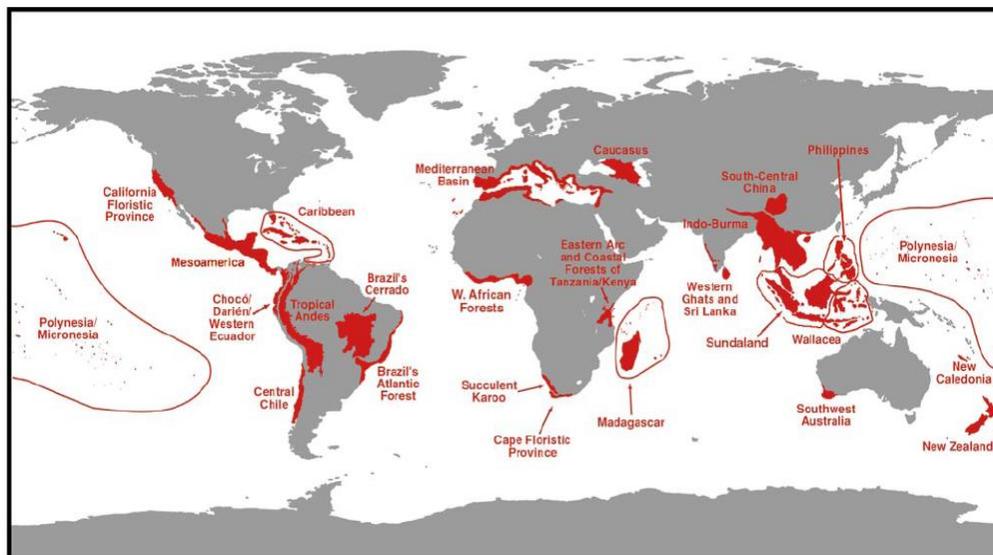


**Figura 16** – Distribuição do Cerrado no Brasil.

Fonte: RATTER *et al.*, 1997.

O Cerrado é considerado um dos biomas mais ameaçados de extinção no mundo, devido o crescente avanço do seguimento agropecuário (QUEIROZ, 2009). Além da rica diversidade biológica, o Cerrado abriga as nascentes de importantes rios de bacias hidrográficas da América do Sul (BRASIL, 1999).

A significativa diversidade vegetal do Cerrado está vivenciando grande perda de *habitat*. Esta condição foi denominada *hotspots* (Figura 17) (MYERS *et al.*, 2000), correspondendo, portanto, as regiões ameaçadas das grandes áreas de biodiversidade no mundo (KLINK; MACHADO, 2005).



**Figura 17** – As 25 áreas conhecidas como *hotspots*.

Fonte: MYERS *et al.*, 2000.

A seguir apresentaremos dados da literatura sobre a família e a espécie estudada neste trabalho.

#### 1.10-1.1. FAMÍLIA COMBRETACEAE

A família Combretaceae pertencente à ordem Myrtales e se divide em 20 gêneros englobando mais de 600 espécies.

#### 1.10-1.2. ESPÉCIES DA FAMÍLIA COMBRETACEAE COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A literatura revela grande número de espécies da família Combretaceae com atividade antifúngica (Tabela 2). De modo geral, a maioria dos extratos de plantas estudada nesta família corresponde a extratos de folhas produzidos com solventes de média polaridade e polares. Quase a totalidade das espécies testadas pertence aos gêneros *Terminalia* e *Combretum*.

**Tabela 2 - Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas**

Espécies	Órgão	Solvente de Extração	Fungos	Substâncias isoladas	Referência
<i>Anogeissus latifolia</i> (Roxb. ex DC.) Wall. ex Guill. & Perr.	Casca do caule	Etanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. albidus</i> , <i>A. flavus</i> e <i>T. rubrum</i>	-	GOVINDARAJAN <i>et al.</i> , 2006
<i>Anogeissus leiocarpus</i> DC.) Guill. et Perr. (L)	Folha, casca da raiz e casca do caule	Água e etanol (50%)	<i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>G. candidum</i> , <i>R. rubra</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>T. viride</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>M. nanum</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. cladosporioides</i>	-	BATAWILA <i>et al.</i> , 2005
<i>Combretum acutifolium</i> Excell	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum adenogonium</i> Steud. ex A. Rich.	Casca do caule	Hexano, metanol (80%) e água	<i>C. albicans</i>	-	MAREGESI <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum albopunctatum</i> Suesseng	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum apiculatum</i> subsp. <i>apiculatum</i>				-	

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

Espécies	Órgão	Solvente de Extração	Fungos	Substâncias isoladas	Referência
<i>Combretum bracteosum</i> (Hochst) Engl. & Diels	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum cafrum</i> (Eckl. & Zeyh) Kuntze				-	
<i>Combretum celastroide</i> var. <i>celastroides</i>				-	
<i>Combretum celastroide</i> var. <i>orientale</i>				-	
<i>Combretum collinum</i> var. <i>suluense</i> (Engl. & Diels) Okafor	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum collinum</i> var. <i>taborense</i> Okafor				-	
<i>Combretum edwardsii</i> Exell				-	
<i>Combretum elaeagnoides</i> Klotzsch	Caule	Metanol e acetato de etila	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>	-	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum erythrophyllum</i> (Burch.) Sond.	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum fragrans</i> F. Hoffm. (L)	Folha	Água e etanol (50%)	<i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>G. candidum</i> , <i>R. rubra</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>T. viride</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>M. nanum</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. cladosporioides</i>	-	BATAWILA <i>et al.</i> , 2005

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

<b>Espécies</b>	<b>Órgão</b>	<b>Solvente de Extração</b>	<b>Fungos</b>	<b>Substâncias isoladas</b>	<b>Referência</b>
<i>Combretum fragrans</i> F. Hoffm.	Madeira do caule	Metanol e acetato de etila	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>	-	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum glutinosum</i> Perr.	Folha	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999
<i>Combretum hereroense</i> Schinz	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum hispidum</i> C. Lawson	Folha	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999
<i>Combretum imberbe</i> Wawra	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum kirkii</i> M.A. Lawson	Folha	Metanol e acetato de etila	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>	-	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum kraussii</i> Hochst.	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

Espécies	Órgão	Solvente de Extração	Fungos	Substâncias isoladas	Referência
<i>Combretum laxum</i> Jacq.	Caule	Etanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. neoformans</i>	β-D-Glucopiranosil 2α,3β,24-trihidroxiolean- 12-en-28-oato, ácido arjunólico, ácido asiático, Arjunglucosideo II, Quadranosideo IV, Bellericosideo, Chebulosideo II, β-D- glucopiranosil, ácido betulínico e Quadranosideo I.	BISOLI <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum microphyllum</i> Klotzsch <i>Combretum moggii</i> Excell	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	- -	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum molle</i> R. Br. ex G. Don	Folha	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999
<i>Combretum molle</i> R. Br. ex G. Don	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum molle</i> R.Br. ex G. Don	Raiz	Metanol e água	<i>C. albicans</i>	-	STEENKAMP <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum mossambicense</i> Engl. <i>Combretum nelsonii</i> Dümmer	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	- -	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

Espécies	Órgão	Solvente de Extração	Fungos	Substâncias isoladas	Referência
<i>Combretum nelsonii</i> Dümmer	Folha	Etanol e Metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	Ácido asiático e arjunólico	MASOKO <i>et al.</i> , 2008b
<i>Combretum nigricans</i> Lepr. ex Guill. & Perr.	Folha e raiz	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999
<i>Combretum padoides</i> Engl. & Diels	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum paniculatum</i> Vent.				-	
<i>Combretum paniculatum</i> Vent.				-	
<i>Combretum petrophilum</i> Retief	Raiz	Metanol e água	<i>C. albicans</i>	-	STEENKAMP <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum woodii</i> Duemmer	Folha	Hexano, acetona, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>M. canis</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2007; MASOKO; ELOFF, 2006
<i>Combretum zeyheri</i> Sond.				-	
<i>Guiera senegalensis</i> J. F. Gmel.	Folha	Etanol (80%)	<i>C. cucumerinum</i>	guieranona A, 5- metildihidroflavasperona e 5-metilflavasperona	SILVA; GOMES, 2003
<i>Pteleopsis suberosa</i>	Goma e casca do caule	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

<b>Espécies</b>	<b>Órgão</b>	<b>Solvente de Extração</b>	<b>Fungos</b>	<b>Substâncias isoladas</b>	<b>Referência</b>
<i>Sclerocarya birrea</i> Hochst.	Casca do caule	Acetona, etanol e metanol	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albidus</i> e <i>R. mucilaginoso</i>	-	MASOKO <i>et al.</i> , 2008
<i>Terminalia alata</i> Roth	Raiz	Metanol (80%)	<i>A. niger</i> e <i>C. albicans</i>	Ácido 3,3'-di-O-metilelágico, 4-O-β-D-glucopiranosil-(1 → 4)-β-D-glucopiranosil-(1 → 2)-α-L-arabinopiranosideo, 5,7,2'-tri-O-metilflavanono 4'-O-α-L-rhamnopiranosil-(1 → 4)-β-D-glucopiranosideo e ácido 2α,3β,19β,23-tetrahidroxiolean-12-en-28-oic, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1 → 3)-β-D-glucopiranosideo-28-O-β-D-glucopiranosideo	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2001
<i>Terminalia arjuna</i> Roxb. ex DC.	Casca do caule	Acetato de etila	<i>A. carthami</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>P. sorghina</i> e <i>S. sclerotiorum</i> .	-	TEJESVI <i>et al.</i> , 2007
<i>Terminalia australis</i> Cambess.	Folha	Metanol e água	<i>C. albicans</i> , <i>C. kruzei</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>A. flavus</i>	-	CARPANO <i>et al.</i> , 2003
<i>Terminalia avicennioides</i> Guill. & Perr.	Folha e casca do caule	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

<b>Espécies</b>	<b>Órgão</b>	<b>Solvente de Extração</b>	<b>Fungos</b>	<b>Substâncias isoladas</b>	<b>Referência</b>
<i>Terminalia belerica</i> Roxb.	Casca do Fruto	Etanol (80%)	<i>P. expansum</i> e <i>C. albicans</i>	termilignana, thannilignana, 7-hidroxi-3',4'-(metilenedioxi)flavan e anolignana B	VALSARAJ <i>et al.</i> , 1997
<i>Terminalia brachystemma</i> Welw. ex Hiern	Folha	Metanol e acetato de etila	<i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	-	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Terminalia brachystemma</i> Welw. ex Hiern	Folha	Acetona, hexano, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> e <i>S. schenckii</i>	-	MASOKO; ELOFF, 2005; MASOKO <i>et al.</i> , 2005
<i>Terminalia catappa</i> L.	Folha	Diclorometano	<i>C. albicans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. rolfsii</i> e <i>A. fumigatus</i>	-	GOUN <i>et al.</i> , 2003
<i>Terminalia catappa</i> L.	Folha	Metanol e água	<i>C. tropicalis</i>	-	NAIR; CHANDA, 2008
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	Folha, casca do caule e fruto	Água	<i>T. tonsurans</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. simii</i> , <i>T. beigelii</i> , <i>M. fulvum</i> , <i>M. gypseum</i> e <i>C. albicans</i>	-	DUTTA <i>et al.</i> , 1998
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	Folha	Água	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. soudanense</i> e <i>C. albicans</i>	-	VONSHAK <i>et al.</i> , 2003
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	Semente	Água	<i>T. glabrata</i>	-	VONSHAK <i>et al.</i> , 2003

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

Espécies	Órgão	Solvente de Extração	Fungos	Substâncias isoladas	Referência
<i>Terminalia glaucescens</i> Planch. ex Benth.	Folha e raiz			-	
<i>Terminalia laxiflora</i> (Engl. et Diels) (L)	Folha	Etanol (50%)	<i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>G. candidum</i> , <i>R. rubra</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>T. viride</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>M. nanum</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. cladosporioides</i> .	-	BATAWILA <i>et al.</i> , 2005
<i>Terminalia macroptera</i> Guill. & Perr.	Folha, casca do caule e casca da raiz			-	
<i>Terminalia macroptera</i> Guill. & Perr.	Caule	Acetato de etila e triclorometano	<i>C. cucumerinum</i>	Ácido 23-galoilarjunólico, β-D-glucopiranosil ester, ácido terminólico, ácido arjúnico, arjungenina, arjunglucosideo 1, ácido sericício e sericosideo	CONRAD <i>et al.</i> , 1998
<i>Terminalia mollis</i> M. Laws.	Folha e casca da raiz	Etanol (50%)	<i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	-	BABA-MOUSSA <i>et al.</i> , 1999
<i>Terminalia mollis</i> M. Laws.	Folha	Metanol e acetato de etila	<i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	-	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Terminalia mollis</i> M. Laws.	Casca do caule e casca da raiz	Metanol (80%) e água	<i>C. albicans</i>	-	MAREGESI <i>et al.</i> , 2008

**Tabela 2 – Espécies da família Combretaceae descritas na literatura por suas atividades antifúngicas (Continuação)**

Espécies	Órgão	Solvente de Extração	Fungos	Substâncias isoladas	Referência
<i>Terminalia mollis</i> M. Laws.	Folha	Acetona, hexano, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> e <i>S. schenckii</i>	-	MASOKO; ELOFF, 2006b; MASOKO <i>et al.</i> , 2005
<i>Terminalia phanerophlebia</i> Engl. & Diels	Folha	Hexano, diclorometano e acetona	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> e <i>S. schenckii</i>	-	SHAI <i>et al.</i> , 2008
<i>Terminalia prunioides</i> M.A. Lawson	Folha	Acetona, hexano, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> e <i>S. schenckii</i>	-	MASOKO; ELOFF, 2006b; MASOKO <i>et al.</i> , 2005
<i>Terminalia sambesiaca</i> Engl. & Diels				-	
<i>Terminalia sambesiaca</i> Engl. & Diels	Folha	Hexano, diclorometano e acetona	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> e <i>S. schenckii</i>	-	SHAI <i>et al.</i> , 2008
<i>Terminalia sericea</i> Burch. ex DC.	Folha	Acetona, hexano, diclorometano e metanol	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> e <i>S. schenckii</i>	-	MASOKO; ELOFF, 2006b; MASOKO <i>et al.</i> , 2005
<i>Terminalia sericea</i> Burch. ex DC.	Raiz	Etanol (80%), Acetato de etila, diclorometano, metanol e butanol	<i>A. niger</i> e <i>C. albicans</i>	-	MOSHI; MBWAMBO, 2005
<i>Terminalia sericea</i> Burch. Ex DC.	Raiz	Metanol e água	<i>C. albicans</i>	-	STEENKAMP <i>et al.</i> , 2007
<i>Terminalia triflora</i> (Griseb.) Lillo	Folha	Metanol	<i>M. gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	-	MUSCHIETTI <i>et al.</i> , 2005

- : não foram isolados e identificadas substâncias. Esses estudos foram realizados somente com os extratos vegetais.

### 1.10-1.3. SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DA FAMIÍLIA COMBRETACEAE

Das folhas de *Combretum nelsonii* foram isolados os triterpenos, ácido asiático e ácido arjunólico com propriedades antifúngicas (MASOKO *et al.*, 2008). Do caule de *Combretum laxum* foram isoladas as substâncias  $\beta$ -D-glucopiranosil 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24-trihidroxiolcano-12-en-28-oate, ácido arjunólico, ácido asiático, arjunglucosídeo II, quadranosídeo IV, bellericosídeo, chebulosídeo II,  $\beta$ -D-glucopiranosil 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,6 $\beta$ -trihidroxiolcano-12-en-28-oate,  $\beta$ -D-glucopiranosil 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23,24-tetrahidroxioleano-12-en-28-oate, ácido betulínico e quadranosídeo I, ativos em *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (BISOLI *et al.*, 2008).

Da raiz de *Terminalia alata* foram isolados os glicosídeos 5,7,2-tri-O-metilflavanona 4'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\beta$ ,23-tetrahidroxioleano-12-en-28-oic acid 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo-28-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo ativos em *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (SRIVASTAVA *et al.*, 2001).

Do caule de *Terminalia macroptera* foram isolados o ácido terminólico, ácido arjunólico, arjungenina, arjunglucosídeo 1, ácido sericício, sericosídeo e os triterpenos ácido 23-galoilarjunólico e  $\beta$ -D-glucopiranosil ativos em *Cladosporium cucumerinum* (CONRAD *et al.*, 1998).

Da casca do caule de *Terminalia bellerica* foram isolados as lignanas termilignana, tanilignana, anolignana B e o flavonóide 7-hidroxi-3',4'-(metilenodioxo) flavano ativos em *Penicillium expansum* e *Candida albicans* (VALSARAJ *et al.*, 1997).

### 1.10-1.4. *Terminalia fagifolia* - OBJETO DE ESTUDO

A espécie *Terminalia fagifolia* Mart. (Figura 18) é conhecida popularmente como cachaporra do gentio, capitão do seco, capitão do mato, mirindiba ou pau de bicho (CORRÊA, 1984). Na medicina tradicional a casca do caule é utilizada para

o tratamento de aftas, tumores e de infecções cutâneas. Trata-se de uma árvore melífera e a sua madeira é empregada na carpintaria na fabricação de móveis (CORRÊA, 1984).



**Figura 18** - Foto de *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae)  
Fonte: Virboga -The Virtual Botanic Garden (<http://www.virboga.de>)

*Terminalia fagifolia* é uma árvore encontrada no Cerrado, assim como no Pantanal Mato-grossense e na caatinga do nordeste brasileiro. Suas folhas são curto-pecioladas, fasciculadas, ovadas ou elípticas, agudas, mucronadas, membranosas, seríceo-vilosas na face inferior. As flores estão dispostas em espigas axilares compostas, mais curtas do que as folhas. O fruto é sâmara elíptica, estriada, bialada e grande (CORRÊA, 1984).

#### Estudos biológicos e substâncias isoladas de *Terminalia fagifolia*

O extrato etanólico das folhas de *T. fagifolia* apresenta atividade antioxidante sendo isolados as substâncias (+)-catequina, 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo do sitosterol,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol, sitosterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, lupeol (SOUZA *et al.*, 2007). Na partição acetoneitrila/clorofórmio do extrato etanólico da madeira e casca do caule foram isolados os compostos 1,3-diarilpropanos, 1-(4'-hidroxi-2'-metoxifenil)-3-(3"-metoxi-4"-hidroxifenil)-propano e 1-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxifenil)-3-(3"-metoxi-4"-hidroxifenil)-propano, sete flavanonas (naringenina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona, sakuranetina, isosakuranetina, 7,4'-dimetoxiflavanona, 7-hidroxi-4'-metoxiflavanona, 7-metoxi-4'-hidroxiflavanona), duas chalconas (2',4'-diidroxi-4-metoxichalcona e 2'-4'-diidroxi-4'-metoxichalcona), uma flavana (7,4'-diidroxi-3'-metoxiflavana) e nove triterpenos pentacíclicos (ácido arjúnico, arjunetina, arjungenina, arjunglucosídeo I, ácido arjunólico, arjunglucosídeo II, 23-galoilarjunglucosídeo (isolado como seus derivados mono-, di- e trimetilados após metilação com diazometano), ácido betulínico e acetato do ácido ursólico, além de ácido gálico e sitosterol. Os autores demonstraram atividade citotóxica destes compostos em células de carcinoma de laringe HEP2 e mucoepidermoide de câncer de pulmão H292 (GARCEZ *et al.*, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1- OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades antifúngicas dos extratos e substâncias isoladas de *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae) com o intuito de subsidiar o desenvolvimento de um novo recurso antifúngico.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade dos extratos de *Terminalia fagifolia* em diferentes polaridades em fungos filamentosos (*Microsporum* e *Trichophyton*) e leveduras (*Candida* e *Cryptococcus*)
- Fracionar os extratos de *T. fagifolia* selecionados
- Determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e substâncias isoladas em cepas ATCC e isolados clínicos de fungos
- Determinar a concentração fungicida mínima das substâncias isoladas em cepas ATCC e isolados clínicos de fungos
- Avaliar as interações entre as substâncias isoladas e os agentes antifúngicos utilizados na terapêutica
- Elucidar provável mecanismo de ação das substâncias isoladas
- Avaliar a citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

A espécie vegetal *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae) foi coletada no bioma Cerrado, em ecossistema Campo Aberto, às margens da BR 070, perto de Águas Lindas de Goiás na altura da barragem do rio Descoberto (S15°77'17,77", W48°23'11,74"), em agosto de 2007, juntamente com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula / UnB. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB), sob o número (UB) 3812.

#### 3.2- PRODUÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

O material vegetal coletado foi encaminhado para o Laboratório Prof. José Elias de Paula - Anexo do Laboratório de Farmacognosia / UnB, para realização dos procedimentos de separação dos órgãos vegetais (folha, casca e madeira do caule). Em seguida, os órgãos foram submetidos ao processo de dessecação e estabilização, em condições de temperatura ambiente, ao abrigo do sol e local arejado (Figura 19a).



**Figura 19a** – Dessecação e estabilização dos diferentes órgãos vegetais.

**19b** – Moinho de facas utilizado na pulverização dos órgãos vegetais

Após esse procedimento, os órgãos foram pulverizados em moinho de facas (Figura 19b), e então encaminhados para o Laboratório de Farmacognosia / UnB. Cada órgão pulverizado foi submetido ao processo de extração por maceração (Figura 20a), em solventes de diferentes polaridades: hexano, acetato de etila e etanol. A solução extrativa foi recuperada por filtração (Figura 20b) e concentrada em rota-evaporador sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C (Figura 20c). O extrato bruto obtido foi depositado no Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado, mantido a -20 °C (Figura 20d). A atividade de acesso ao patrimônio genético para pesquisa foi autorizada sob o n. 06/2012 de acordo com a Resolução CGEN n. 35, após análise vinculada às informações e termos do processo 02000.002272/2006-73.



**Figura 20** – (a) Processo de extração por maceração, (b) Filtração para a obtenção da solução da solução extrativa, (c) Concentração em rota-evaporador, (d) Armazenamento do extrato bruto a -20 °C.

### 3.3- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Para a realização do isolamento de substâncias foram utilizadas técnicas de cromatografia como colunas aberta de sílica e sephadex, com monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD).

#### 3.3-1. FRACIONAMENTO QUÍMICO

Inicialmente os extratos foram fracionados utilizando coluna aberta de sílica gel 60 (Macherey-Nagel®) com mesh de 230-400, ou sílica gel 60 (Vetec®) com mesh de 70-230, utilizando a proporção de 1 g de extrato bruto para cada 20 g de sílica. Como fase móvel foram usados os solventes ciclohexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol, isoladamente e em ordem de polaridade - do mais apolar para o mais polar. Foram obtidas as frações ciclohexânica, diclorometânicas, acetato de etila, etanólicas e metanólicas.

#### 3.3-2. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES EM SÍLICA

Para o isolamento foi utilizado coluna aberta de sílica gel (Macherey-Nagel®) com mesh de 230-400, utilizando a proporção de 1 g de amostra para 80 g de sílica. Como fase móvel foi utilizado ciclohexano, acetato de etila e metanol, iniciando-se com 100% de ciclohexano, aumentando a polaridade com acetato de etila até atingir 100% e finalizando com 100% de metanol, sendo as variações do sistema eluente de 5% em cada troca.

#### 3.3-3. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES EM SEPHADEX LH-20

Para o fracionamento das frações mais polares foi utilizado coluna aberta em sephadex LH-20 (Sigma®). A coluna de sephadex promove a separação das substâncias segundo a massa molecular, onde as moléculas maiores são eluídas

primeiramente e as de menor tamanho são eluídas por último. O eluente da fase móvel foi o metanol.

### 3.3-4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A técnica de cromatografia em camada delgada foi utilizada para acompanhar o fracionamento, possibilitando a reunião das frações segundo o perfil cromatográfico. Foram utilizadas placas de CCD sílica gel 60 de 0,20 mm de espessura com indicador de fluorescência UV 254, da marca Macherey-Nagel®. As placas foram visualizadas pela fluorescência em luz ultravioleta e reveladas com vanilina sulfúrica.

### 3.4- TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO

Os espectros 1D e 2D de RMN ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC e NOESY) foram obtidos utilizando o espectrômetro Avance 400 Bruker, a 400.13 MHz para os espectros de  $^1\text{H}$  e a 100.61 MHz para espectros de  $^{13}\text{C}$ , equipado com sonda de núcleo quádruplo (QNP) de 5 mm. Todos os espectros foram adquiridos em acetona deuterada, e os desvios químicos foram reportados em ppm ( $\delta$ ) relativo a tetrametilsilano (TMS).

#### 3.4-1. REAÇÃO DE METILAÇÃO

A reação de metilação foi feita adicionando-se em 25,6 mg da amostra um volume de 94  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfato com 134 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anidro em 3 mL de acetona seca, e aquecimento sob refluxo por 5,5 h. Após o arrefecimento a reação foi concentrada sob pressão reduzida. A mistura bruta foi suspensa em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (80:1), seguido da filtração em sílica gel e abundante lavagem com  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . O filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida (CONRAD *et al.*, 2001).

### 3.5- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

#### 3.5-1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS

As cepas fúngicas utilizadas na realização dos testes de atividade estão descritas na tabela 3. Cepas LMGO (Laboratório de Micologia de Goiás) correspondem a isolados clínicos de pacientes do Hospital da Universidade Federal de Goiás.

**Tabela 3** – Cepas ATCC e isolados clínicos de fungos utilizados na investigação

Tipo de fungo	Espécie	Código
Levedura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
		LMGO 05
		LMGO 30
		LMGO 16
		LMGO 102
		LMGO 90
	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
		LMGO 05
	<i>Candida glabrata</i>	LMGO 44
	<i>Candida tropicalis</i>	LMGO 49
	<i>Candida krusei</i>	LMGO 174
<i>Cryptococcus neoformans</i>	LMGO 02	
	ATCC 28957 D	
	LMGO L1	
Dermatófitos	<i>Cryptococcus gattii</i>	ATCC 24065 B
	<i>Microsporum gypseum</i>	LMGO 10
	<i>Trichophyton rubrum</i>	LMGO 06
		LMGO 08
	<i>Microsporum canis</i>	LMGO 22
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	LMGO 09	
	LMGO 18	

### 3.5-2. TESTE DE MICRODILUIÇÃO

O teste de microdiluição permite quantificar a atividade antifúngica de amostras e controles positivos determinando a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo. A metodologia adotada para a realização do teste de microdiluição foram provenientes dos protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para os testes em leveduras utiliza-se o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008a) e para os fungos filamentosos M38-A2 (CLSI, 2008b).

#### 3.5-2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS

Os extratos foram diluídos em DMSO a 100 mg/mL, sendo esta a solução mãe. Na realização do teste a solução teste é obtida diluindo a solução mãe em meio RPMI obtendo a concentração de 4 000 µg/mL, e concentração final de DMSO inferior a 5% (v/v).

#### 3.5-2.2. PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Os controles positivos utilizados nos testes foram anfotericina B, flucitosina, itraconazol e fluconazol, sendo este último utilizado somente em leveduras. Os controles itraconazol, anfotericina B, que são solúveis em DMSO foram preparados na concentração de 1 600 µg/mL, segundo as normas do CLSI, ou seja, em uma concentração no mínimo 100 vezes maior do que a concentração a ser testada, no caso 16 µg/mL. Já os controles fluconazol e flucitosina, que são solúveis em água foram preparados na concentração de 640 µg/mL, segundo as normas do CLSI, ou seja, no mínimo 10 vezes a maior concentração a ser testada, no caso 64 µg/mL. A concentração dos controles a serem testadas é produzida por diluição em RPMI 1640. Os controles negativos utilizados foram: meio RPMI 1640 (100%), DMSO (5%).

### 3.5-2.3. PREPARO DO MEIO RPMI 1640

O meio utilizado foi o RPMI 1640 com vermelho de fenol e sem bicarbonato de sódio. O meio desidratado (10,4 g) foi reconstituído em água destilada até a obtenção de 1,0 L de meio de cultura. Para tal adicionou-se cerca de 900 mL de água destilada em um béquer de 1000 mL, verteu-se o meio desidratado e agitou-se com um bastão de vidro até a completa dissolução. O meio foi então tamponado com ácido 3-[*N*-morfolino]-propoanossulfônico (MOPS) 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até pH 7,0, medido com o auxílio de um potenciômetro previamente calibrado. Em seguida, adicionou-se água destilada, até completar o volume de um litro.

Esse meio foi filtrado na capela de fluxo laminar utilizando-se um sistema de filtração à vácuo com poro de membrana de 0,22 µm. Três alíquotas de 3 mL desse meio foram colocadas na estufa à 37 °C para controle de esterilidade, permanecendo por 5 dias. Esse meio foi armazenado a 4 °C por até duas semanas.

### 3.5-2.4. PREPARO DO INÓCULO DE LEVEDURAS

Os fungos foram inoculados em meio de ágar batata dextrose, incubados à 35 °C, por um período de 48 h. Para obtenção do inóculo com o número necessário de estruturas jovens, ou seja, em fase logarítma de crescimento foi realizada uma subcultura/repique, 48 h antes da realização do teste de avaliação da atividade das amostras. Para tal, o fungo foi retirado do meio, com o auxílio de uma alça de platina e transferido para um tubo de ensaio contendo solução salina estéril 0,85%, até que a suspensão alcance o grau 0,5 na escala de McFarland, ou seja, aproximadamente  $10^6$  células por mL (transmitância de 80-85% em comprimento de onda de 530 nm). Em seguida, essa suspensão é diluída em RPMI em duas etapas. A primeira corresponde a uma solução 1:50, ou seja, uma parte da suspensão salina para 49 partes de meio RPMI, obtendo-se assim a

solução intermediária. Outra diluição é realizada na proporção de 1:20, obtendo-se o inóculo na concentração 2 vezes ao do teste,  $1,0 \times 10^3$  a  $5,0 \times 10^3$ , que após a diluição com amostra/meio, o poço possuirá uma concentração final de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL por mL.

#### 3.5-2.5. PREPARO DO INÓCULO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Uma subcultura/repique dos fungos filamentosos foi realizada cinco dias antes da realização do teste de determinação da concentração inibitória mínima. No dia do teste, verteu-se solução salina estéril 0,85% no tubo de ensaio contendo o fungo e utilizou-se uma alça de platina, para raspar a superfície do fungo. Os conídios resultantes e partículas de hifas foram transferidos para tubos estéreis e deixados em repouso por 15 a 20 min à temperatura ambiente. A densidade foi ajustada até a transmitância de 70-72% em comprimento de onda de 520nm. A suspensão foi diluída em meio de RPMI, na proporção de 1:50, ou seja, uma parte da suspensão salina para 4 partes de meio RPMI. Tal diluição resulta no inóculo que será utilizado no teste com uma concentração de células variando de  $2 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  UFC/mL.

#### 3.5-2.6. PROCEDIMENTO DO TESTE

O teste de microdiluição é realizado em placa estéril de 96 poços de fundo redondo. Inicialmente foi colocado 100  $\mu$ L de meio RPMI em todos os poços da placa. Em seguida nos poços da primeira coluna, adicionou-se 100  $\mu$ L do extrato e dos controles positivos, previamente diluídos na concentração de teste. Desse modo todos os poços da primeira coluna ficaram com um volume de 200  $\mu$ L. Com o auxílio de uma pipeta automática com oito canais, regulada para 100  $\mu$ L foi feita a diluição seriada até a coluna de número dez, desprezando-se ao final os 100  $\mu$ L restantes. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L do inóculo em todas as colunas com exceção da coluna doze. Desse modo, a concentração do extrato no primeiro poço

é de 1 000 µg/mL. Para as substâncias isoladas a concentração do primeiro poço foi de 256 µg/mL. A coluna onze corresponde ao controle negativo, pois contém o meio RPMI e o micro-organismo. A coluna doze corresponde ao controle de esterilidade do meio, pois contém apenas o meio RPMI. As placas são tampadas e embaladas com filme PVC individualmente. As placas podem ser empilhadas em um máximo de cinco por pilha e são então incubadas à 35 °C, por 48 h no caso das leveduras e por 5 dias no caso dos dermatófitos.

### 3.5-2.7. LEITURA DOS RESULTADOS

A leitura do resultado foi realizada visualmente da direita para a esquerda (CLSI 2008a; CLSI, 2008b), observando o crescimento do fungo no poço. O primeiro poço onde não é observado o crescimento do fungo é considerado o valor da CIM. Em caso de inibição do crescimento do fungo em todos os poços foi realizado um novo teste começando de uma concentração menor.

### 3.6- CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A técnica de concentração fungicida mínima (CFM) tem por objetivo caracterizar a atividade da amostra em fungicida ou fungistática. No primeiro caso a amostra é capaz de gerar a morte do fungo, enquanto no segundo, a amostra apenas impede/atrapalha o seu crescimento. Após a realização do ensaio de CIM, 40 µL dos poços que apresentaram 100% de inibição são transferidos para placas de Petri contendo o meio de ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas à 35 °C por 48 h para leveduras e por 5 dias para dermatófitos. A leitura foi realizada verificando-se o crescimento fúngico. A menor diluição que não se observa o crescimento fúngico é considerada a CFM, caso ocorra o crescimento fúngico em todos os poços considera-se o valor de CIM como concentração fungistática mínima (ESPINEL-INGROFF, 2001). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.7- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONÁRIA (CIF) - TESTE *IN VITRO* DE INTERAÇÃO COM FÁRMACOS

O ensaio de interação com fármacos tem por objetivo avaliar os efeitos da interação da substância em presença dos fármacos utilizados na terapêutica, o que permite categorizar os efeitos como antagônico, aditivo, indiferente e sinérgico. A cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi escolhida como modelo biológico para ser avaliado, uma vez que, trata-se de uma cepa padronizada. Os controles positivos utilizados no teste foram itraconazol, fluconazol, anfotericina B e flucitosina.

Seguindo o protocolo M27-A3 do CLSI foi realizado a determinação do CIM da amostra e dos controles positivos. Para a determinação da concentração inibitória fracionária (CIF) foi realizado o ensaio de “tabuleiro de xadrez” (checkerboard) (ODDS, 2003). Nesse ensaio utiliza-se placa de 96 poços onde horizontalmente ocorre a diluição da amostra e no sentido vertical dos controles positivos. Deste modo, tem-se nos poços uma associação da amostra com os controles positivos. Para determinar a concentração inicial em que se inicia o ensaio multiplica-se por quatro o valor de CIM determinado previamente. As placas são incubadas por à 35 °C por 48 h, e transcorrido esse prazo, observa-se a maior diluição em que observamos a inibição de 100% no crescimento fúngico. O valor de CIF é calculado dividindo o valor de CIM da associação amostra/controle pelo CIM da amostra e do controle sozinho.

Para a categorização dos efeitos é necessário calcular o índice da concentração inibitória fracionária (ICIF), que consiste no somatório do CIF de cada associação. Valores de ICIF  $\leq 0,5$  são classificados como efeito sinérgico; ICIF  $< 0,5$  e  $\leq 1$  efeito aditivo; ICIF  $< 1$  e  $\leq 4$  efeito indiferente e ICIF maiores que 4 efeitos antagônicos (GRECO *et al.*, 1995).

### 3.8- AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO VIA MEMBRANA

#### 3.8-1. TESTE COM SORBITOL

O sorbitol é um agente osmótico capaz de facilitar a estabilização de membranas celulares. Diante dessa propriedade, caso uma amostra atue desestabilizando a membrana fúngica o sorbitol agirá contra a ação dessa amostra. Portanto, o teste com sorbitol visará avaliar se a amostra atua desestabilizando a membrana fúngica.

A cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada no teste. Inicialmente calcula-se o CIM segundo o protocolo do M27-A3 do CLSI utilizando anfotericina B como controle positivo. Em seguida, calcula-se o valor da CIM, porém suplementando o meio RPMI 1640 com sorbitol 0,8 M (ESCALANTE *et al.*, 2008). Caso a amostra atue promovendo a desestabilização da membrana fúngica o valor de CIM aumentará no ensaio realizado em presença de sorbitol.

### 3.8-2. TESTE COM ERGOSTEROL LIVRE

O ergosterol é um componente da membrana celular dos fungos. Fármacos como a anfotericina B ligam-se ao ergosterol do fungo desestabilizando a membrana e promovendo o extravasamento do conteúdo celular. O intuito deste teste é avaliar se o mecanismo de ação da amostra é via ligação ao ergosterol.

A cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 é utilizada no teste. Para a realização do ensaio, inicialmente é realizada a determinação do CIM segundo o protocolo M27-A3 do CLSI, com a amostra e o controle positivo anfotericina B. Em seguida, é realizado outro teste, adicionando ao meio RPMI 1640, concentrações de ergosterol variando de 200 a 50 µg/mL (diluição seriada). Em ambos os casos a anfotericina B foi utilizada como controle positivo. Caso a amostra atue como antifúngico via ligação ao ergosterol, a adição do ergosterol exógeno diminuirá a concentração da fração livre da amostra para atuar no ergosterol da parede celular fúngica, conseqüentemente, o valor de CIM dessa amostra aumentará na presença do ergosterol exógeno (ESCALANTE *et al.*, 2008).

### 3.8-3. TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

Para a realização da dosagem lipídica, o ergosterol foi extraído conforme o método de quantificação de esterol (MQE) descrito por Arthington-Skaggs (1999) com algumas modificações. Previamente foi feito o repique de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 B em ágar Sabouraud dextrose. Na fase logarítmica de crescimento fúngico, uma alíquota foi retirada e feita uma suspensão em salina estéril na concentração  $1-2 \times 10^7$  células/mL. Em 30 mL de caldo Sabouraud dextrose contendo a substância em estudo ou itraconazol (controle positivo), nas concentrações de inibição dos micro-organismos e em concentrações sub-inibitórias (CIM e a 1/2CIM), foram adicionados 2 mL da suspensão padronizada. Todos os tubos foram mantidos por 72 h sob agitação a 200 rpm a 35 °C.

A suspensão de células foi transferida para tubos Falcon e centrifugada a 3700 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com água destilada, e o peso do pellet obtido foi determinado. Ao sedimento seco foi adicionado 5 mL de solução hidro alcoólica de hidróxido de potássio (25 g de hidróxido de potássio, 35 mL de água destilada e álcool 98% quantidade suficiente para 100 mL). As suspensões das células foram agitadas por 1 min e incubadas em banho maria a 85 °C por 4 h, e em seguida resfriados a temperatura ambiente.

O esterol foi extraído pela adição de uma mistura de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de *n*-heptano seguida de agitação vigorosa em vórtex por 3 min. Uma alíquota de 200 µL da solução foi diluída em 800 µL de etanol P.A. e analisada em espectrofotômetro em intervalo de 200 a 350 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O conteúdo de ergosterol foi calculado pela porcentagem do peso seco das células, conforme descrito por Arthington-Skaggs (1999) usando-se as equações:

$$\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{281.5}/A_{290}) \times F] / \text{ massa pellet}$$

$$\% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{230}/A_{518}) \times F] / \text{ massa pellet}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE}] - \% \text{ 24(28) DHE}$$

Onde, F é fator de diluição em etanol do esterol, A é a absorbância nos comprimentos de onda em 281,5, 230, 290 ou 518 nm e 24(28)DHE é 24,28-dehidroergosterol.

#### 3.8-4. TESTE DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para determinação da integridade da membrana e do metabolismo da célula fúngica foi utilizada a metodologia proposta por PINA-VAZ *et al.* (2005) e PINTO *et al.* (2009). A análise por citometria de fluxo foi realizada usando um citômetro Accuri C6 (Becton Dickinson Biosciences) de laser azul de argônio em um comprimento de onda de 488 nm.

As cepas *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 B e *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 D foram semeadas por duas vezes em ágar Sabouraud dextrose, para assegurar a pureza e viabilidade da colônia. Em seguida, o isolado foi inoculado em caldo Sabouraud dextrose e incubado overnight sob agitação a 200 rpm a 35 °C. As células foram centrifugadas e lavadas com solução PBS suplementada com 2% de glicose (pH 7,0) e ajustadas à concentração de  $10^6$  células/mL, por meio da contagem em câmara de Neubauer.

As concentrações da substância em estudo foram produzidas em eppendorfs (CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM) em meio RPMI, assim como os controles positivos: álcool 70 °GL, para a avaliação da membrana, e azida (35 mg/mL), para avaliação da atividade metabólica. Foram feitos os controles de autofluorescência (células não exposta aos marcadores) e o controle negativo (células expostas somente aos marcadores). Aos eppendorfs foram adicionadas as suspensões de leveduras e foram incubados a 35 °C em banho-maria durante 30 min. Após a incubação, as células tratadas foram lavadas e ressuspensas em solução PBS suplementada com 2% de glicose. Em seguida foi adicionado os marcadores: 5 µL de iodeto de propídio (PI) à 1 µM/mL (para avaliação da integridade da membrana) ou 15 µL de FUN-1 à 0,5 µM (para avaliação da atividade metabólica). Os eppendorfs foram incubados a 35 °C por 30 minutos na ausência de luz.

Após a incubação a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, onde o gate foi estabelecido e a compensação realizada com o controle de autofluorescência. As leituras foram feitas a partir 10 000 eventos. A análise PI foi feita em FL-1 (530 nm) e de FUN-2 em FL-3 (650 nm).

### 3.9- TESTE DE CITOXICIDADE

A citotoxicidade da substância e controles positivos foi determinada em células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Sangue heparinizado de doadores saudáveis, não fumantes e que não ingeriram qualquer tipo de fármacos 15 dias antes da coleta foi usado para a obtenção das células CMSP. Foi utilizado o método padronizado de centrifugação de densidade-gradiente de Ficoll-Hypaque. CMSP foram lavadas e ressuspendidas à concentração de  $10^6$  células/mL e plaqueadas em placas de 96 poços com meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e fitohemaglutinina (2%, Sigma).

Depois de 24 h a substância e os controles positivos do teste antifúngico - anfotericina B, itraconazol e fluconazol foram dissolvidas em DMSO e adicionadas em cada poço (diluição seriada), as culturas foram incubadas por 69 h. Doxorubicina (0,01-5 µg/mL, Sigma) foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo foi utilizado DMSO na mesma concentração das amostras. O crescimento celular foi quantificado pela habilidade das células vivas em reduzir o corante amarelo brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)2,5-diphenil-2H-tetrazolium (MTT) no produto azul/roxo de formazan (Mosmann, 1983). Ao final da incubação as placas foram centrifugadas e o meio foi substituído por meio fresco (150 µL) contendo MTT (0,5 mg/mL). As placas foram incubadas por três horas e depois centrifugadas. O formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi mensurada usando um leitor de multiplacas (DTX 880 Multimode Detector,

Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA). O efeito da substância e controles positivos foi quantificado como a porcentagem da absorbância do corante reduzido em relação ao controle negativo à 595 nm. Os valores obtidos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Os dados de  $CI_{50}$  apresentados foram determinados com intervalo de confiança de 95% de dois experimentos realizados independentes e em duplica.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E TRIAGEM BIOLÓGICA

O estudo de *Terminalia fagifolia* Mart., espécie da família Combretaceae, utilizada na medicina tradicional para o tratamento de infecções de pele (CORRÊA, 1984) permitiu produzir oito extratos brutos.

A tabela 4 apresenta o rendimento dos extratos, obtidos por maceração, a partir das folhas, e da madeira e casca do caule, em hexano, acetato de etila e etanol. O extrato hexânico da madeira do caule não foi produzido pela falta do solvente hexano. Os extratos etanólicos apresentaram maiores rendimentos, especialmente o extrato da madeira do caule (33%).

**Tabela 4** – Extratos produzidos por maceração à partir de *T. fagifolia* e seus respectivos rendimentos

Órgão	Solvente	Rendimento dos extratos (%)
Folha	Hexano	4,6
	Acetato de etila	11,3
	Etanol	15,8
Casca do caule	Hexano	0,3
	Acetato de etila	9,0
	Etanol	26,1
Madeira do caule	Acetato de etila	3,6
	Etanol	33,0

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi determinada em leveduras - *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019; e em dermatófitos - *M. gypseum* LMGO 10, *T. rubrum* LMGO 08 e *M. canis* LMGO 22. Os extratos que apresentaram valores de CIM  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$  em ao menos um dos fungos testados, foram avaliados nos demais fungos usados no estudo: nas leveduras *C. albicans* LMGO 102, *C. parapsilosis* LMGO 05, *C. glabrata* LMGO 44, *C. krusei* LMGO 174, *Cryptococcus neoformans* LMGO 02, *Cryptococcus gattii*

LMGO L1, e nos dermatófitos *T. rubrum* LMGO 08, *T. mentagrophytes* LMGO 09 e LMGO 18.

Analisando a literatura, não existe consenso formado sobre qual o valor de CIM classifica o extrato como promissor para o isolamento de substâncias antifúngicas. Alguns trabalhos apontam valores de CIM  $\leq 1000$   $\mu\text{g/mL}$ , outros  $< 500$   $\mu\text{g/mL}$  (WEBSTER *et al.*, 2008, ALGIANNIS *et al.*, 2001). Nosso grupo de pesquisa estabeleceu como critério de seleção de extratos valores de CIM  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$  (ALBERNAZ *et al.*, 2010).

Interessante observar que dentre os 8 extratos testados, um total de 4 apresentaram forte atividade: acetato de etila da casca do caule, e etanólicos da casca do caule, madeira do caule e folha, com valores de CIM variando entre 0,24 e 7,81  $\mu\text{g/mL}$  em leveduras e, 15,6 e 125  $\mu\text{g/mL}$  em dermatófitos. Os outros 4 extratos foram inativos (Tabelas 5 e 6).

Em *C. albicans* LMGO 102, os valores de CIM variaram entre 0,97 e 1,95  $\mu\text{g/mL}$ , mesmo que este isolado clínico, segundo o perfil de sensibilidade seja resistente ao fluconazol (CIM  $> 64$   $\mu\text{g/mL}$ ) e ao itraconazol (CIM  $> 16$   $\mu\text{g/mL}$ ). Em *C. krusei* LMGO 174, o extrato acetato de etila da casca do caule foi tão ativo (CIM 0,97  $\mu\text{g/mL}$ ) quanto o controle itraconazol (CIM 1  $\mu\text{g/mL}$ ), e bem mais ativo que o fluconazol (CIM 8  $\mu\text{g/mL}$ ). O amplo espectro de atividade destes 4 extratos em *Candida albicans*, principal agente responsável por candidíase, e em *Candida não-albicans*, pelas quais se observa um aumento de incidência em todo mundo (AL-RAWAHI *et al.*, 2013), reforça a potencialidade de isolamento de substâncias antifúngicas.

Para *Cryptococcus gattii* LMGO L1 e *Cryptococcus neoformans* LMGO 02, os extratos acetato de etila e etanólico da casca do caule apresentaram os melhores valores de CIM do estudo - 0,24 e 0,48  $\mu\text{g/mL}$ . Para estas cepas os valores de CIM dos controles foram: itraconazol - 0,25  $\mu\text{g/mL}$  e fluconazol - 2  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 5). Estes fungos são causadores da criptococose, uma doença

grave que pode levar ao óbito e com crescente incidência principalmente nos grandes centros urbanos (SMITH *et al.*, 2014).

Em dermatófitos os valores de CIM dos extratos etanólicos variaram entre 15,6 e 62,5 µg/mL para todos os isolados clínicos testados: *T. rubrum* LMGO 06 e LMGO 08, *T. mentagrophytes* LMGO 09 e LMGO 18, *M. gypseum* LMGO 10, e *M. canis* LMGO 22.

De acordo com as atividades encontradas na triagem antifúngica foram selecionados os extratos etanólicos da folha, casca do caule e madeira do caule e o extrato acetato de etila casca do caule para dar prosseguimento aos estudos. Sendo estes mesmo extratos selecionados para os estudos de fracionamento e isolamento de substância.

**Tabela 5** – Concentração inibitória mínima de extratos de *T. fagifolia* em leveduras, valores expressos em µg/mL.

Espécie	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> LMGO 102	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	<i>C. glabrata</i> LMGO 44	<i>C. krusei</i> LMGO 174	<i>C. neoformans</i> LMGO 02	<i>C. gattii</i> LMGO L1
Órgão <sup>a</sup> (solvente) <sup>b</sup>								
F (H)	>1000	NT	>1000	NT	NT	NT	NT	NT
F (A)	>1000	NT	>1000	NT	NT	NT	NT	NT
F (E)	1,95	1,95	1,95	1,95	7,81	3,90	1,95	1,95
CC (H)	500	NT	>1000	NT	NT	NT	NT	NT
CC (A)	0,97	0,97	0,97	0,97	7,81	0,97	0,48	0,24
CC (E)	0,97	0,97	0,97	0,97	7,81	3,90	0,48	0,24
MC (A)	500	NT	500	NT	NT	NT	NT	NT
MC (E)	0,97	0,97	0,97	0,97	3,9	1,95	0,97	0,97
Controles Positivos								
Itraconazol	0,5	> 16	0,25	0,25	1	1	0,25	0,25
Fluconazol	1	> 64	1	1	8	8	2	2

<sup>a</sup>F: folha; CC: casca do caule; MC: madeira do caule

<sup>b</sup>H: hexano, A: acetato de etila, E: etanol

NT: não testado

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima de extratos de *T. fagifolia* em dermatófitos, valores expressos em µg/mL.

Espécie	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
Órgão <sup>a</sup> (solvente) <sup>b</sup>	LMGO 10	LMGO 22	LMGO 08	LMGO 06	LMGO 09	LMGO 18
F (H)	>1000	500	NT	500	NT	NT
F (A)	500	500	NT	500	NT	NT
F (E)	62,5	31,2	31,2	31,2	31,2	15,6
CC (H)	>1000	500	NT	>1000	NT	NT
CC (A)	125	62,5	31,25	125	62,5	31,2
CC (E)	31,2	31,2	31,2	15,6	31,2	15,6
MC (A)	500	>1000	NT	500	NT	NT
MC (E)	62,5	31,2	15,6	62,5	62,5	62,5
Controles Positivos						
Itraconazol	0,5	0,25	1	0,5	1	0,5

<sup>a</sup>F: folha; CC: casca do caule; MC: madeira do caule

<sup>b</sup>H: hexano, A: acetato de etila, E: etanol

NT: não testado

#### 4.2- FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATIVOS

No fracionamento do extrato etanólico da folha de *T. fagifolia* (400 mg) em cinco polaridades (Tabela 7) e a avaliação antifúngica das respectivas frações, observou-se que a parte mais apolar do extrato é a responsável pela atividade – fração ciclohexano. Interessante constatar que esta fração é a que apresentou o maior rendimento (39%). O valor de CIM da fração ciclohexano foi de 1,95 µg/mL para as duas cepas ATCC de *Candida* (Tabela 7)

**Tabela 7** – Fracionamento do extrato etanólico da folha de *T. fagifolia* e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL

Frações/Controles	Quantidade (mg)	Rendimento (%)	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Ciclohexano	156	39	250	125	1,95	1,95
Diclorometano	15,9	4,0	1000	>1000	500	500
Acetato de etila	11,9	3,0	1000	1000	1000	1000
Etanol	134,6	33,7	1000	1000	1000	1000
Metanol	48,5	12,1	1000	1000	1000	1000
Controles Positivos						
Itraconazol			0,5	1	0,5	0,25
Fluconazol			NT	NT	1	1

NT: não testado; - : não ativo

No fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *T. fagifolia* (400 mg) a elevada atividade antifúngica ficou retida entre a fração ciclohexano (CIM 1,95 µg/mL em *Candida* spp.) e as frações polares -, etanol (CIM 0,97 µg/mL em *C. albicans* e 1,95 µg/mL em *C. parapsilosis*) e metanol (CIM 0,48 µg/mL em *C. albicans* e 0,24 µg/mL em *C. parapsilosis*). A fração metanólica foi mais ativa que o controle positivo fluconazol (CIM 1 µg/mL) e tão ativa quanto o itraconazol (CIM entre 0,5 e 0,25 µg/mL). As frações polares foram também ativas em dermatófitos (Tabela 8).

**Tabela 8** – Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *T. fagifolia* e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL

Frações/Controles	Quantidade (mg)	Rendimento (%)	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Ciclohexano	80,7	20,17	250	500	1,95	1,95
Diclorometano	16,1	4,0	1000	>1000	500	500
Acetato de etila	20,3	5,1	1000	1000	1000	1000
Etanol	162,3	40,6	125	250	0,97	1,95
Metanol	52,8	13,2	125	125	0,48	0,24
Controles Positivos						
Itraconazol			0,5	1	0,5	0,25
Fluconazol			NT	NT	1	1

NT: não testado; - : não ativo

No fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de *T. fagifolia* (400 mg) observamos a manutenção da atividade nas frações obtidas em etanol e em metanol. A fração metanólica foi mais ativa em leveduras com CIM de 0,97 µg/mL em *C. albicans* ATCC 10231 e 0,48 µg/mL em *C. parapsilosis* ATCC 22019, sendo estes valores melhores que o fluconazol (CIM 1 µg/mL). A fração etanólica foi a mais ativa para dermatófito com CIM de 125 µg/mL para o isolado clínico *T. rubrum* LMGO 06 (Tabela 9).

**Tabela 9** – Fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de *T. fagifolia* e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL

Frações/Controles	Quantidade (mg)	Rendimento (%)	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Ciclohexano	3,1	0,775	>1000	>1000	>1000	>1000
Diclorometano	7,5	1,9	1000	1000	1000	1000
Acetato de etila	7,9	2,0	>1000	>1000	>1000	>1000
Etanol	148,3	37,1	125	250	3,9	7,8
Metanol	105,4	26,4	250	250	0,97	0,48
Controles Positivos						
Itraconazol			0,5	1	0,5	0,25
Fluconazol			NT	NT	1	1

NT: não testado; - : não ativo

O extrato etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia* (400 mg) foi fracionado e as frações em acetato de etila, etanol e metanol apresentaram elevada atividade, com CIM de 125 a 31,25 µg/mL em dermatófitos e de 0,12 a 0,06 µg/mL em leveduras. Estas frações foram muito mais ativas em *Candida* spp. do que os controles positivos itraconazol e fluconazol. O maior rendimento foi o da fração etanólica (37,5%) (Tabela 10).

**Tabela 10** – Fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia*, e as respectivas atividades antifúngicas expressas em µg/mL

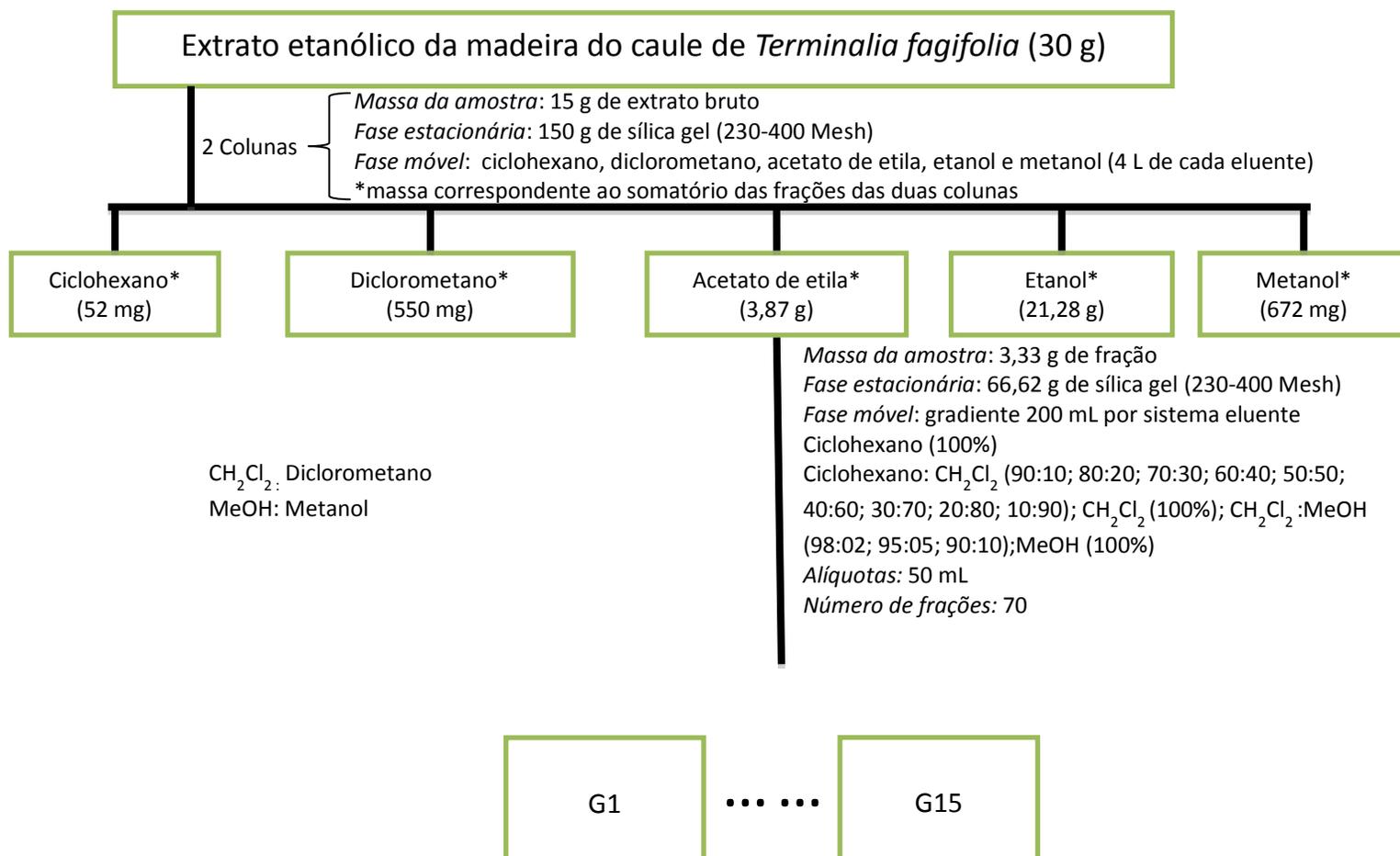
Frações/Controles	Quantidade (mg)	Rendimento (%)	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Ciclohexano	34,4	8,6	500	1000	>1000	>1000
Diclorometano	8,5	2,1	500	500	500	500
Acetato de etila	2,1	0,5	125	62,5	0,12	0,12
Etanol	149,8	37,5	62,5	31,25	0,12	0,12
Metanol	64,4	16,1	62,5	62,5	0,06	0,06
Controles Positivos						
Itraconazol			0,5	1	0,5	0,25
Fluconazol			NT	NT	1	1

NT: não testado; - : não ativo

Diante da significativa atividade antifúngica observada nas frações do extrato bruto etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia*, este foi selecionado para dar continuidade ao estudo químico.

#### 4.3- ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA MADEIRA DO CAULE DE *Terminalia fagifolia*

A Figura 21 esquematiza o fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia*, que será detalhado adiante.



**Figura 21** – Organograma do fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia*.

O fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia*, em coluna de sílica gel 60 (70 – 230 mesh, Merck) foi realizado em duas etapas, utilizando em cada uma delas um total de 15 g de extrato. A atividade antifúngica foi mantida para as mesmas frações observadas com a coluna “piloto” – frações em acetato de etila, em etanol e em metanol – com valores de CIM entre 0,12 e 0,24 µg/mL em leveduras, e 31,25 e 125 µg/mL em dermatófitos (Tabela 11). E o maior rendimento continuou a ser o da fração etanólica (70,9%).

**Tabela 11** – Fracionamento do extrato etanólico da madeira do caule de *T. fagifolia* (2 x 15 g), e as respectivas atividades antifúngicas.

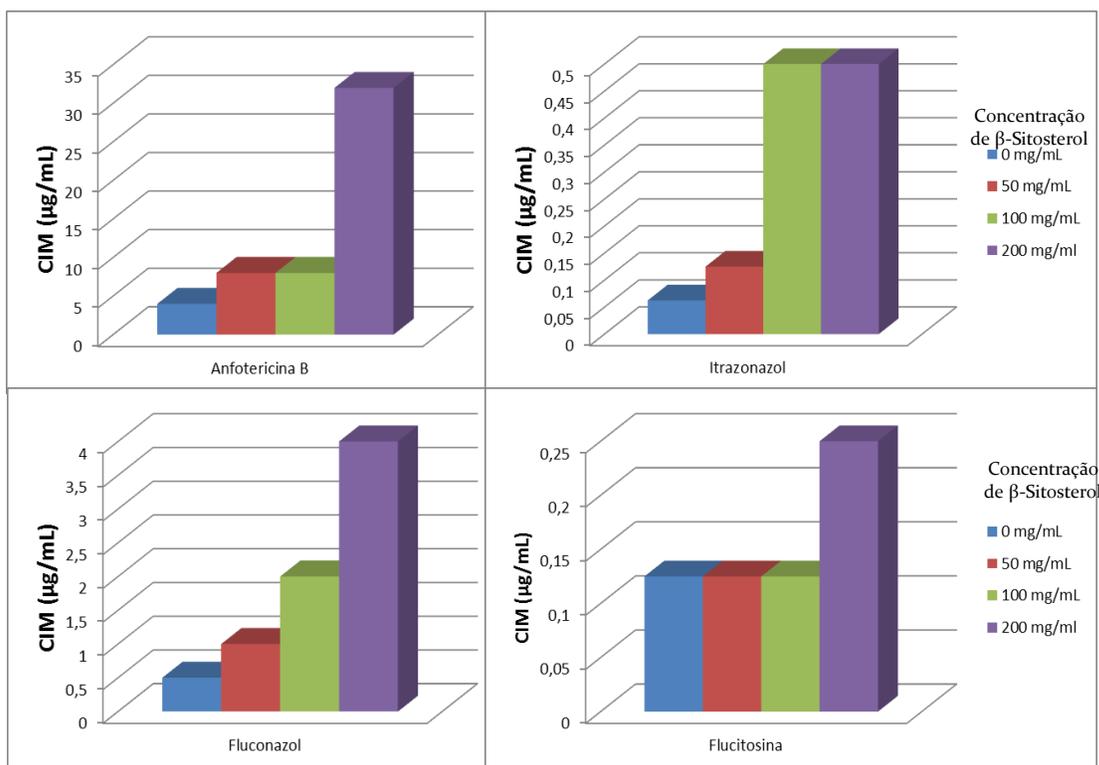
Frações/Controles	Quantidade (mg)	Rendimento (%)	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Ciclohexano	52	0,2	500	1000	>1000	>1000
Diclorometano	550	1,8	500	1000	500	1000
Acetato de etila	3874	12,9	125	62,5	0,12	0,24
Etanol	21283	70,9	31,25	31,25	0,24	0,12
Metanol	672	2,2	62,5	31,25	0,12	0,12
Controles Positivos						
Itraconazol			0,5	1	0,5	0,25
Fluconazol			NT	NT	1	1

NT: não testado; - : não ativo

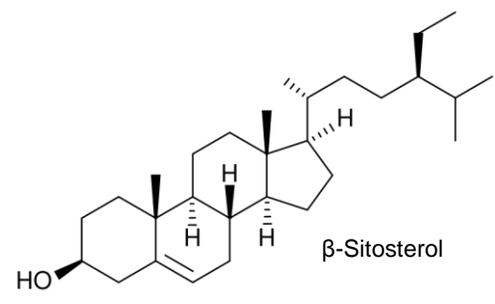
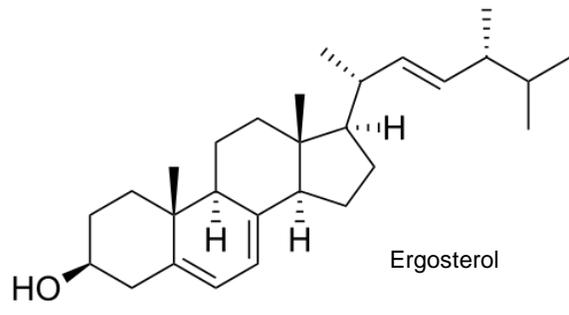
#### 4.4- ATIVIDADE DO $\beta$ -SITOSTEROL

O ensaio com o extrato etanólico da folha de *T. fagifolia* permitiu o isolamento do  $\beta$ -sitosterol. Este fitoesterol, comumente encontrado em plantas, não foi ativo em *C. parapsilosis* ATCC 22019. Ao contrário, observamos crescimento do fungo, em comparação aos demais poços que não continham  $\beta$ -sitosterol. Diante dessa observação, pensou-se na possibilidade do  $\beta$ -sitosterol alterar a ação de agentes antifúngicos.

Para avaliar essa hipótese foi determinado o valor de CIM dos controles positivos em presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -sitosterol. A figura 29 ilustra que a presença do  $\beta$ -sitosterol diminuiu, principalmente a ação antifúngica da anfotericina B. Semelhança estrutural é observada entre os dois compostos, e talvez, parte do fármaco possa estar se ligando ao  $\beta$ -sitosterol ao invés de se ligar ao ergosterol da membrana fúngica.



**Figura 29** – Efeitos (valor de CIM) dos agentes antifúngicos em presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -sitosterol.



## 5. REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, L. C., 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: 116-121, 2010.
- ALGIANNIS, N., KALPOTZAKIS, K., MITAKU, S., CHINO, L. B., Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40: 4168-4170, 2001.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, 28:197-201, 2010.
- AMERSON, E. H., MAURER, T. A. Dermatologic manifestations of HIV in Africa. HIV. **International AIDS Society – USA**, 18(1): 16-22, 2010.
- ARENAS, R., RUIZ-ESMENJAUD, J. Onychomycosis in childhood: a current perspective with emphasis on the review of treatment. **An bras Dermatol**, 79(2): 225-232, 2004.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A., JRADI, H., DESAI, T., & MORRISON, C. J. (1999). Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of clinical microbiology**, 37(10): 3332-3337, 1999.
- BABA-MOUSSA, F., AKPAGANA, K., BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 66: 335-338, 1999.
- BADDLEY, J.W., PAPPAS, P.G. Antifungal combination therapy: clinical potential. **Drugs**, 65(11): 1461-1480, 2005.

- BADIEE, P., ALBORZI, A., DAVARPANAH, M, A., SHAKIBA, E. Distributions and Antifungal Susceptibility of Candida Species from Mucosal Sites in HIV Positive Patients. **Archives of Iranian Medicine**, 13(4): 282-287, 2010.
- BADIEE, P., ALBORZI, A., SHAKIBA, E., FARSHAD, S., JAPONI, A. Susceptibility of Candida species isolated from immunocompromised patients to antifungal agentes. **Eastern Mediterranean Health Journal**, 17(5): 425-430, 2011.
- BAGINSKI, M., CZUB, J. Amphoteicin B and its new derivatives – mode of action. **Current Drug Metabolism**, 10(5): 459-469, 2009.
- BATAWILA, K., KOKOU, K., KOUMAGLO, K., GBÉASSOR, M., DE FOUCAULT, B., BOUCHET, P., AKPAGANA, K. Antifungal activities of Five Combretaceae used in Togolese traditional medicine. **Fitoterapia**, 76: 264-268, 2005.
- BERGOLD, A.M., GEORGIADIS, S. Novidades em Fármacos Antifúngicos: Uma Revisão. Ed. Visão Acadêmica, 2(5): 159-169, 2004.
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.
- BISOLI, E. GARCEZ, W. S., HAMERSKI, L., TIEPPO, C., GARCEZ, F. R. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. **Molecules**, 13: 2717- 2728, 2008.
- BISOLI, E. GARCEZ, W. S., HAMERSKI, L., TIEPPO, C., GARCEZ, F. R. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. **Molecules**, 13: 2717-2728, 2008
- BORGERS, M., DEGREEF, H., CAUWENBERGH, G. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. **Current Drug Targets**, 6: 849–862, 2005.

BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>, acessado no dia 11/02/2014, 2014.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE - Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil, em comemoração ao Dia Mundial da Biodiversidade. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169) acessado em 20/06/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde do Brasil. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do Programa Nacional de DST / AIDS. Brasília, DF (<http://www.aids.gov.br>), 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Brasília: 1999. 26p.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual Review of Immunology**, 23(29): 1-21, 2011.

BURLAUD, A., MATHIEU, D., FALISSARD B., TRIVALLE, C. Mortality and bloodstream infections in geriatrics units. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, 51: 106-109, 2010.

BYRNES, E. J. 3rd, BARTLETT, K. H., PERFECT, J. R., HEITMAN, J. Cryptococcus gattii: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection**, 2011. doi:10.1016/j.micinf.2011.05.009.

CANUTO, M. M., RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infect. Dis.**, 2: 550–63, 2002.

- CARPANO, S. M., SPEGAZZINI, E. D., ROSSI, J. S., CASTRO, M. T., DEBENEDETTI, S. L. Antifungal activity of *Terminalia australis*, **Fitoterapia**, 74: 294-297, 2003.
- CARVALHO, G. B. M., BENTO, C. V., SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro 1º parte – as leveduras. **Revista Analytica**, 25: 36-42, 2006.
- CATE, J. M. T., KLIS, F. M., PEREIRA, T. C., CRIELAARD, W., GROOT, P. W. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **Journal of Dental Research**, 88(2): 105-115, 2009.
- CHAMILOS, G., KONTOYIANNIS, D. P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resist. Updat.**, 8: 344–358, 2005.
- CHI, H. W., YANG, Y. S., SHANG, S. T., CHEN, K. H., YEN, K. M., CHANG, F. Y., LIN, J. C. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infection. The comparison of risk factors and outcome. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, 2011. doi:10.1016/j.jmii.2010.08.010
- CLSI (2008a). "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts – Approved Standard – Third Edition" CLSI Document M37-A3.
- CLSI (2008b). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, 2nd edn. Document M38-A2. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- COLOMBO, A. L., GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(5): 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L., MELO, A. S. A., ROSAS, R. F. C., SALOMÃO, R., BRIONES, M., HOLLIS R. J., MESSER, S. A., PFALLER, M. A. Outbreak of

- Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 46:253–257, 2003.
- CONRAD, J., VOGLER, B., KLAIBER, I., ROOS, G., WALTER, U., KRAUS, W. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. **Phytochemistry**, 48(4): 647-650, 1998.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. 1ª Ed. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro 1978.
- DA SILVA, K. B., FREIRE, A. K., DOS SANTOS A. B., DE LIMA I. S., SANTOS, L. O., DOS SANTOS, M. S., DE SOUZA, J. V. Characterisation of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans* – *C. gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 2011. doi:10.1016/j.riam.2011.05.003.
- DAWSON AL, DELLAVALLE RP, ELSTON DM. Infectious skin diseases: A review and needs assessment. **Dermatologic Clinics**, (30)141-51, 2012.
- DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**, 166: 257–265, 2008.
- DENNERSTEIN, G. J., ELLIS, D. H. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. **The Australian & New Zealand Journal of obstetrics & Gynaecology**, 41:326–328, 2001.
- DISMUKES, W. E. Antifungal therapy: lessons learned over the past 27 years. **Clinical Infectious Diseases**, 42(9): 1289-1296, 2006.
- DUTTA, B. K., RAHMAN, I., DAS, T. K. Antifungal activity of Indian plant extracts. **Mycoses**, 41: 535-536, 1998.

- ESCALANTE, A., GATTUSO, M., PEREZ, P., ZACHINO, S. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J. Nat. Prod.**, 71: 1720-1725, 2008.
- ESPINEL-INGROFF, A. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. **J Clin Microbiol.**, 39: 954–958. 2001.
- FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(2): 167-194, 2006.
- FRANGOULIS, E., ATHANASOPOULOU, B., KATSAMBAS, A. Etiology of tinea capitis in Athens, Greece a 6-year (1996-2001) retrospective study. **Mycoses**, 47: 208-212, 2004.
- GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., SANTANA, A. L. B. D., ALVEZ, M. M., MATOS, M. F. C., SCALIANTE, A. M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 17(7): 1223-1228, 2006.
- GHANNOUM, M. A., HAJJEH, R. A., SCHER, R. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution and antifungal susceptibility patterns. **Journal of The American Academy of Dermatology**, 43:641-648, 2000.
- GHIZELINI, A. M., AUER, C. G., PIMENTEL, I. C. Fungos presentes em acículas de *Pinus taeda* em estágios iniciais de decomposição no campo. **Bol. Pesq. Fl.**, 53: 155-178, 2006.
- GIANNINI, P. J., KISHORE, V. S., Diagnosis and management of oral candidiasis. **Otolaryngologic Clinics of North America**, 44: 231–240, 2011.

- GILMAN, A. F. As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª Ed. Editora McGraw-Hill, Rio de Janeiro 2003. 971p.
- GINTER-HANSELMAYER, G., WEGER, W., ILKIT, M. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns. **Mycoses**, 50(2): 6-13, 2007.
- GOUN, E., CUNNINGHAM, D., CHU, D., NGUYEN, C., MILES, D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, 76: 592-596, 2003.
- GOVINDARAJAN, R., VIJAYAKUMAR, M., SINGH, M., RAO, C. V., SHIRWAIKAR, A., RAWAT, A. K. S., PUSHPANGADAN, P. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, 106: 57-61, 2006.
- GRECO, W.R., BRAVO, G., PARSONS, J.C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacol. Ver.** 47: 331-385. 1995.
- HAMDAN, J. S., HAHN, R. C. Antifungal drugs for systemic mycosis: an overview of mechanism of action and resistance. **Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry**, 5(4): 403-412, 2006.
- HAMILL, R.J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, 73(9): 919-934, 2013.
- HANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R. J. Farmacologia. 6ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2001.
- HARIDASAN, M. Aluminum accumulation by some Cerrado native species in Central Brazil. **Plant and Soil**, 65: 265-273, 1982.
- HAVLICKOVA, B., CZAICA, V.A., FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, 51(4): 2-15, 2008.

- HAY, R. J., ROBLES, W., MIDGLEY, G. Tinea capitis in Europe: new perspective on an old problem. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 15:229-233, 2001.
- HOWARD, S. J., WEBSTER, I., MOORE, C. B., GARDINER, R. E., PARK, S., PERLIN, D. S., DENNING, D. W. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 28: 450–453, 2006.
- IBRAHIM, M.A., NA, M., OH, J., SCHINAZI, R.F., MCBRAYER, T.R., WHITAKER, T., DOERKSEN, R.J., NEWMAN, D.J., ZACHOS, L.G., HAMANN, M.T. Significance of endangered and threatened plant natural products in the control of human disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 42(110): 16832-16837, 2013.
- JUNIOR, J. A. L. S., DAVID, C. M., HATUM, R., SOUZA, P C. S. P., JAPIASSU, A., PINHEIRO, C. T. S., FRIEDMAN, G., DA SILVA, O. B., DIAS, M. D., KOTERBA, E., DIAS, F. S., PIRAS, C., Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, 18(1): 9-17, 2006.
- JÚNIOR, J. E. A. B., PFENNING, L. H. Associação de *Pseudothraulis cocodes* e seu anamorfo com *Machaerium villosum*. **Fitopatologia Brasileira**, 31(1): 102-105, 2006.
- KAUR, I.P., KAKKAR, S. Topical delivery of antifungal agents. **Expert opinion on drug delivery**, 7(11): 1303-1327, 2010.
- KLINK, C. A., MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, 1(1): 147: 155, 2005.
- KOKIL, S., BHATIA, M. Antifungal azole metabolites: significance in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Medical Biochemistry**, 28(1): 1-10, 2009.

- KOKSAL, F., ER. E., SAMASTI, M. Causative agents of superficial mycoses in Istanbul, Turkey: retrospective study. **Mycopathologia**,168: 117–123, 2009.
- KRUTMANN, J. Pre- and probiotics for human skin. **Journal Dermatological Science**, 54(1): 1-5, 2009.
- LIU, M., SEIDEL, V., KATERERE, D. R., GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, 42: 325-329, 2007.
- MACDOUGALL, L., FYFE, M., ROMNEY, M., STARR, M., GALANIS, E. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, 17(2): 193-199, 2011.
- MAREGESI, S. M., PIETERS, L., NGASSAPA, O. D., APERS, S., VINGERHOETS, R., COS, P., BERGHE, D. A. V., VLIETINCK, A. J. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 119: 58-66, 2008.
- MASOKO, P., ELOFF, J. N. Bioautography indicates the multiplicity of antifungal compounds from twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). **African Journal of Biotechnology**, 5(18): 1625-1647, 2006.
- MASOKO, P., ELOFF, J. N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, 4(12): 1425-1431, 2005 MASOKO, P., MDEE, L. K., MAMPURU, L. J., ELOFF, J. N. Biological activity of two related triterpenes isolated from *Combretum nelsonii* (Combretaceae) leaves. **Natural Product Research**, 22(12): 1074-1084, 2008b.

- MASOKO, P., MMUSHI, T. J., MOGASHOA, M. M., MOKGOTHO, M. P., MAMPURU, L. J., HOWARD, R. L. In vitro evaluation of the antifungal activity of *Sclerocarya birrea* extracts against pathogenic yeasts. **African Journal of Biotechnology**, 7(20): 3521-3526, 2008.
- MASOKO, P., PICARD, J., ELOFF, J. N. Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 99: 301-308, 2005.
- MASOKO, P., PICARD, J., ELOFF, J. N. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). **South African Journal of Botany**, 73: 173-183, 2007.
- MATTA, D. A., ALMEIDA, L. P., MACHADO, A. M., AZEVEDO, A. C., KUSANO, E. J. U., TRAVASSOS, N. F., SALOMÃO, R., COLOMBO, A. L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995–2003. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 57: 399–404, 2007.
- MAURY, C. M. (Org). Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA, DF. 2002. 404 p.
- MIKELSAAR, M. Human microbial ecology: lactobacilli, probiotics, selective decontamination. **Anaerobe**, XX: 1-5, 2011. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.07.005.
- MIKULSKA, M., NOVELLI, A., AVERSA, F., CESARO, S., DE ROSA, F.G., GIRMENIA, C., MICOZZI, A., SANGUINETTI, M., VISCOLI, C. Voriconazole in clinical practice. **Journal of chemotherapy**, 24(6): 311-327, 2012.

- MOLINA, D. A. Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 29(3): 33-39, 2011.
- MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, 166: 285-294, 2008.
- MOREIRA, T. A., FERREIRA, M. S., RIBAS, R. M., BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 39:255-258, 2006.
- MOSHI, M. J., MBWAMBO, Z. H. Some pharmacological properties of extracts of *Terminalia sericea* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, 97: 43-47, 2005.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.
- MOYES, D. L., NAGLIK, J. R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection, **Clinical & Developmental Immunology**, 2011. doi: 10.1155/2011/346307.
- MÜLLER, G.G., KARA-JOSÉ, N., DE CASTRO, R.S. Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. **Rev Bras Oftalmol.**, 72(2): 132-141, 2013.
- MUÑOZ, P., GUINEA, J., ROJAS, L., BOUZA, E. New antifungal agents for the treatment of candidaemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 36S: S63-S69, 2010.

- MUSCHIETTI, L., DERITA, M., SULSEN, V., MUÑOZ, J. D., FERRARO, G., ZACCHINO, S., MARTINO, V. In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 102: 233-238, 2005.
- MUSIOL, R., MROZEK-WILCZKIEWICZ, A., POLANSKI, J. Synergy Against Fungal Pathogens: Working Together is Better Than Working Alone. **Current medicinal chemistry**, 21(7):870-893, 2014.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858, 2000.
- NAIR, R., CHANDA, S. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betel* leaf extract. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 70(3): 390-398, 2008.
- NEJI, S., MAKNI, F., CHEIKHROUHO, F., SELLAMI, A., SELLAMI, H., MARRECKCHI, S., TURKI, H., AYADI, A. Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. **Mycoses**, 52: 534–538, 2009.
- NEWLAND, J. G., ABDEL-RAHMAN, S. M. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. **Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology**, 2: 49-63, 2009.
- NEWMAN, D. J., CRGG, G. M., SNADER, K. M., Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, 66: 1022-1037, 2003.
- NOGUEIRA, J. C. R., DINIZ, M. F. F. M., LIMA, E. O., LIMA. Z. N. Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos obtidos de otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 74(4): 526-530, 2008.

- ODDS, F.C. Synergy, antagonism, what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 52(1):1, 2003.
- OLIVEIRA, C. A. F., GERMANO, P. M. L. Aflotoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. **Revista de Saúde Pública**, 31(4): 417-424, 1997.
- OLIVEIRA, P. S., MARQUIS, R. J. The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. Nova Yorque: Columbia University Press, 2002. 398 p.
- PALACIO, A. D., VILLAR, J., ALHAMBRA, A., Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 26(1): 2-7, 2009.
- PANDA, D., RATHINASAMY, K., SANTRA, M. K., WILSON, L. Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102(28): 9878-9883, 2005.
- PAYA, C. V. Fungal infections in solid organ transplantation. **Clinical Infection Disease**, 16: 677-681, 2000.
- PEREIRA, E. G., SIQUEIRA, J. O., CURI, N., MOREIRA, F. M. S., PURCINO, A. A. C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 8(1): 59-65, 1996.
- PEREZ, M.A., CORTES, L.J., GUERRA, A.P., KNUDSON, A., USTA, C., NICHOLLS, R.S. Efficacy of the amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine combination and of chloroquine for the treatment of malaria in Córdoba, Colombia, 2006. **Biomedica**, 28(1): 148-159, 2008.

- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem, **Clinical Microbiology Reviews**, 20(1): 133-163, 2007.
- PINA-VAZ, C., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., RODRIGUES, A. G., & ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *Journal of clinical microbiology*, 43(9): 4674-4679, 2005.
- PINTO, E., VALE-SILVA, L., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of medical microbiology**, 58(11): 1454-1462, 2009.
- QUEIROZ, F. A. Impacts of the international trade of soybeans on the biodiversity of Cerrado Savannah. **Sociedade & Natureza**, 21(2): 193-209, 2009.
- RATHINASAMY, K., JINDAL, B., ASTHANA, J., SINGH, P., BALAJI, P. V., PANDA, D. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. **BMC Cancer**, 10: 213, 2010.
- RATTER, J. A., RIBEIRO, J. F, BRIDGEWATER, S. The brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann. Bot.**, 80: 223-230, 1997.
- RÉCAMIER, K. S., HERNÁNDEZ-GÓMEZ, A., GONZÁLEZ-DAMIÁN, J., ORTEGA-BLAKE, I. Effect of membrane structure on the action of polyenes: nystatin action in cholesterol and ergosterol containing membranes. **The Journal of Membrane Biology**, 237(1): 31-40, 2010.
- RODLOFF, C. KOCH, D., SCHAUMANN, R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. **European Journal of Medical Research**, 16(4): 187-195, 2011.

- RODRIGUEZ-CREIXEMS, M., ALCALA, L., MUÑOZ, P., CERCENADO, E., VICENTE, T., BOUZA, E. Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload incidence and etiology, 1985-2006. **Medicine**, 87:234-249, 2008.
- SBAMPATO, C. G., ABREU, L. R., FURTADO, M. M. Gorgonzola type chese manufactured with milk pasteurized by the HTST and steam ejector systems: physic-chemical and sensory parameters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(1): 191-200, 2000.
- SCHARDL, C. L., PANACCIONE, D. G., TUDZYNSKI, P. Ergot alkaloids-biology and molecular biology. **The Alkaloids Chemical and Biology**, 63: 45-86, 2006.
- SEEBACHER, C., BOUCHARA, J. P., MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections, **Mycopathologia**, 166: 335-352, 2008.
- SEGAL, B. H., BOW, E. J., MENICHETTI, F. Fungal infections in nontransplant patients with hematologic malignancies. **Infectious Disease Clinics of North America**, 16: 935–964, 2002.
- SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 2883-2894, 2001.
- SHAI, L. J., MCGAW, L. J., MASOKO, P., ELOFF, J. N. Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. **South African Journal of Botany**, 74: 677-684, 2008.
- SILVA, O., GOMES, E. Guieranone A, a naphthyl butanone from the leaves of *Guiera senegalensis* with antifungal activity. **Journal of Natural Products**, 66(3): 447-449, 2003.
- SILVA, P. R., RABELO, R. A. S., TERRA, A. P. S., TEIXEIRA, D. N. S. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans*

isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(2): 158-162, 2008.

SKEHAN , P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.

SLOAN, D., DLAMINI, S., PAUL, N., DEDICOAT, M. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis o resource-limited settings. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 8(4), 2008.

SMITH, R.M., MBA-JONAS, A., TOURDJMAN, M., SCHIMEK, T., DEBESS, E., MARSDEN-HAUQ, N., HARRIS, L.R. Treatment and Outcomes among Patients with *Cryptococcus gattii* Infections in the United States Pacific Northwest. **PloS one**, doi: 10.1371/journal.pone.0088875. eCollection 2014, 9(2), 2014.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, 269:1962-1971, 2007.

SONG, J. C., DERESINSKI, S. Hepatotoxicity of antifungal agents. **Current Opinion in Investigational Drugs**, 6(2): 170-177, 2005.

SOUZA, L. F. Recursos vegetais usados na medicina tradicional do Cerrado (comunidade de Baús, Acorizal, MT, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 9(4): 44-54, 2007.

SRIVASTAVA, S. K., SRIVASTAVA, S. D., CHOUKSEY, B. K. New antifungal constituents from *Terminalia alata*, **Fitoterapia**, 72: 106-112, 2001.

SRIVASTAVA, S. K., SRIVASTAVA, S. D. New biologically active constituents from *Terminalia chebula* stem bark. **Indian journal of chemistry section b-organic chemistry including medicinal chemistry**, 43(12): 2731-33, 2004.

- STAMFORD, T. L. M., ARAUJO, J. M., STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microorganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 18(4): 382-385, 1998.
- STEENKAMP, V. FERNANDES, A. C., VAN RENSBURG, C. E. J. Screening of venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **South African Journal of Botany**, 73: 256-258, 2007.
- SUCHER, A. J., CHAHINE, E. B., BALCER, H. E. Echinocandins: the newest class of antifungals. **The Annals of Pharmacotherapy**, 43(10): 1647-1657, 2009.
- TANEJA, J., BHARGAVA, A., LOOMBA, P., DOGRA, V., THAKUR, A., MISHRA, B. Cryptococcal granulomas in na immunocompromised HIV-negative patient. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, 51(4): 554-555, 2008.
- TANIWAKI, M. H., HOCKING, A. D., PITT, J. I., FLEET, G. H. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, 132(2-3): 100-108, 2009.
- TEJESVI, M. V., KINI, K. R., PRAKASH, H. S., SUBBIAH, V., SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, 24: 37-54, 2007.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. *Microbiologia*, 7ª Edição, Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2002.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. *Microbiologia*, 8ª Edição, Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2005.

- VALSARAJ, R., PUSHPANGADAN, P., SMITT, U. W., ADSERSEN, A., CHRISTENSEN, S. B., SITTIE, A., NYMAN, U., NIELSEN, C., OLSEN, C. E. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal, compounds from *Terminalia bellerica*. **Journal of Natural Products**, 60: 739-742, 1997.
- VALSARAJ, R., PUSHPANGADAN, P., SMITT, U. W., ADSERSEN, A., CHRISTENSEN, S. B., SITTIE, A., NYMAN, U., NIELSEN, C., OLSEN, C. E. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal, compounds from *Terminalia bellerica*. **Journal of Natural Products**, 60: 739-742, 1997.
- VAN DER MEER, J. W. M., VAN DE VEERDONK, F. L., JOOSTEN, L. A. B., KULLBERG, B. J., NETEA, M. G. Severe *Candida* ssp. infections: new insights into natural immunity. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 36S: S58-S62, 2010.
- VAZQUEZ, J. A., SOBEL, J. D. Mucosal candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 16(4): 793-820, 2002.
- VONSHAK, A., BARAZANI, O., SATHIYAMOORTHY, P., SHALEV, R., VARDY, D., GOLAN-GOLDHIRSH, A. Screening South Indian medicinal plants for antifungal activity against cutaneous pathogens. **Phytotherapy Research**, 17(9): 1123-1125, 2003.
- WALDORF, A. R., POLAK, A. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. **Antimicrobial, Agents and Chemotherapy**, 23(1): 79-85, 1983.
- WANG, H.W., YANG, S.H., HUANG, G.D., LIN, J.K., CHEN, W.S., JIANG, J.K., LAN, Y.T., LIN, C.C., HWANG, W.L., TZENG, C.H., LI, A.F.Y, YEN, C.C., TENG, H.W. Temsirolimus enhances the efficacy of cetuximab in colon cancer through a CIP2A-dependent mechanism. **J Cancer Res Clin Oncol**, DOI 10.1007/s00432-014-1596-4, 2014.

- 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: 140-146, 2008.
- WHITE, T. C., MARR, K. A., BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11(2): 382–402, 1998.
- WILLE, M.P., ARANTES, T.D., DA SILVA, J.L.M. Epidemiology of dermatomycoses in population in the outskirts of Araraquara – SP. **Rev. Bras. Clin. Med.**, 7:2 95-298, 2009.
- ZARDO, V., MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp.. **NewsLab**, 63: 136-146, 2004.
- ZONIOS, D. I., BENNETT, J. E. Update on azole antifungals. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 29(2): 198-210, 2008.