

FLÁVIA BERALDO OLIVEIRA

**Busca de novos compostos antifúngicos a partir de três espécies de vegetais**

Belo Horizonte  
2009

FLÁVIA BERALDO OLIVEIRA

**Busca de novos compostos antifúngicos a partir de três espécies de vegetais**

**Orientação: Patrícia Silva Cisalpino**

**Co-orientação: Suzana Johann**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial a obtenção do grau de especialista em Microbiologia.

Belo Horizonte  
2009

*"Que eu não perca a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda.  
Que eu não perca a luz e o brilho no olhar, mesmo sabendo que muitas coisas que eu verei no mundo escurecerão meus olhos.  
Que eu não perca a garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são adversários extremamente perigosos.  
Que eu não perca a vontade de doar este enorme amor que existe em meu coração, mesmo sabendo que muitas vezes ele será submetido e até rejeitado.  
Que eu não perca a vontade de ser grande, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...."  
(Chico Xavier)*

## RESUMO

Dentre as micoses sistêmicas e endêmicas destaca-se a paracoccidioidomicose (PCM) que é de grande interesse para os países da América Latina e é causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. No adulto a forma clínica predominante é a crônica, mas quando acomete crianças ou adolescentes apresenta-se na forma aguda ou subaguda. Esta micose representa um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca, principalmente para segmentos sociais específicos, como os trabalhadores rurais que, além de tudo, isso apresentam grandes deficiências de acesso e suporte de rede dos serviços de saúde favorecendo o diagnóstico tardio. As plantas medicinais produzem uma variedade de compostos conhecidos por suas propriedades terapêuticas tornando-se, desta forma, promissoras fontes de novas drogas. O objetivo deste trabalho foi testar a atividade antifúngica de extratos das partes aéreas das seguintes plantas: *Piper regnelli*, *Inga dulcis* e *Baccharis dracunculifolia* contra o fungo causador de paracoccidioidomicose.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*; *Piper Regnell*; *Inga dulcis* e *Baccharis dracunculifolia*.

## SUMÁRIO

<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>II- REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	9
1.1- Paracoccidioidomicose.....	9
1.2- Plantas Medicinais.....	16
1.2.1- <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	17
1.2.2- <i>Ingá dulcis</i> .....	18
1.2.3- <i>Piper regnellii</i> .....	18
1.3- A busca de novos compostos antifúngicos.....	19
<b>III - OBJETIVOS</b> .....	23
<b>IV - METODOLOGIA</b> .....	24
4.1 – Meios de cultura.....	24
4.2 - Preparo do Inoculo.....	24
4.3 – Testes de susceptibilidade antifúngica.....	25
4.3.1 - Método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	25
4.3.2 - Método de micro diluição para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	26
<b>V - RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	27
<b>VI – CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

## I- INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilizam plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. Inclui-se neste contexto populações que as usam *in natura* por opção, ou por ser a única alternativa disponível e os sistemas de medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas, como a medicina chinesa. Desde 1977, a OMS tem incentivado o estudo de plantas conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer os riscos de seu uso indevido.

A utilização das propriedades terapêuticas das plantas medicinais é uma prática milenar encontrada nos tratados de fitoterapia das grandes civilizações, muitas delas já extintas. Também são encontradas nas tradições orais de tribos indígenas e povos de todos os continentes, principalmente, dos índios brasileiros que com frequência são abordados por pesquisadores estrangeiros ávidos por descobrir substâncias naturais abundantes em nossa flora tropical que sejam capazes de serem transformadas em medicamentos. Estudos arqueológicos têm mostrado através da análise de pólen e outros materiais que “o homem das cavernas” já utilizava plantas para a cura de doenças.

O desenvolvimento da química orgânica e da tecnologia industrial têm permitido a análise, isolamento, refino e síntese dos princípios ativos das plantas. Um exemplo desse desenvolvimento é ilustrado na história da aspirina que foi originada a partir de pesquisas com extratos obtidos da casca da árvore salgueiro (*Salix spp.*), que já era indicada por médicos do antigo Egito e da antiga Grécia para o controle de inflamações. Depois de analisado e sintetizado por químicos alemães o ácido acetilsalicílico tornou a Aspirina o medicamento de maior sucesso no século XX com mais de 100 bilhões de comprimidos vendidos em todo o mundo e cuja produção atinge cerca de 100 toneladas por ano. A flora brasileira é riquíssima em espécies com princípios ativos de importância terapêutica, com potencialidades não apenas de utilização na medicina natural, como também na agricultura natural, no controle integrado de pragas e doenças de plantas cultivadas.

Portanto, o Brasil, com sua imensa diversidade vegetal e portador da maior floresta tropical e úmida do planeta, é alvo para a descoberta de novas substâncias com atividades

farmacológicas. Estima-se que 20% do patrimônio genético mundial esteja concentrado em território nacional, onde o índice de endemismo é altíssimo.

É muito comum encontrar nas feiras livres do Brasil barracas expondo ervas medicinais à venda. Grande parte das plantas medicinais são formadas por árvores cujas cascas, ricas em taninos e quinonas, apresentam características fitoterápicas relacionadas ao controle de diversos microrganismos e processos inflamatórios. Muitas dessas características já estão comprovadas cientificamente como as da aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi.*) que é antiinflamatória e bactericida; do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), antiinflamatório, bactericida e analgésico; do ipê-roxo (*Tabebuia avelanadae Lor. ex. Griseb.*), antitumoral e antimicrobiano e da quixaba (*Bumelia sartorum M.*) que é antiinflamatória. Ervas aromáticas, como o alho e o gengibre, também são conhecidas milenarmente por suas propriedades medicinais. O alho (*Allium sativum L.*), rico em alicina e aliina, possui ação antiviral e bactericida, enquanto que o gengibre (*Zingiber officinale Rox.*) possui ogingerol e o shogaol que são potentes moluscidas.

As plantas medicinais produzem uma variedade de compostos conhecidos por suas propriedades terapêuticas, tornando-se, desta forma, promissoras fontes de novas drogas. Muitas espécies contêm fenóis, quinonas, saponinas, flavanóides e terpenóides em quantidades apreciáveis para, além de repelir insetos, também prevenir a ocorrência de doenças de plantas.

Uma vez que estas plantas produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de pesquisas direcionados à triagem, possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antimicrobianos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes.

A alta incidência de patógenos multirresistentes, implica na impotência da ação de antimicrobianos convencionais, resultando no surgimento de novas doenças infecciosas e

ressurgimento de outras que já pareciam controladas. São, portanto, indispensáveis programas direcionados ao desenvolvimento de novas drogas, buscando soluções na privilegiada biodiversidade brasileira, por meio da descoberta de novas moléculas com interesse terapêutico ou do desenvolvimento de fitofármacos genuinamente brasileiros. Desta forma sabe-se que o estudo fitoquímico de plantas poderá servir de base para o desenvolvimento de novos métodos de controle de microrganismos na medicina veterinária e humana.

A paracoccidiodomicose, doença causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, tem destaque entre as doenças de difícil erradicação, sendo um problema de saúde pública para países latinos como o Brasil. Usualmente, a droga mais utilizada para o tratamento desta micose é a Anfotericina B, que possui uma grande atividade nefrotóxica entre outros diversos efeitos colaterais. Outro fármaco que também pode ser utilizado é a associação de sulfametoxazol com trimetropim que, no entanto, possui potencial reduzido.

As lesões pelo fungo podem ser cutâneas limitadas ou se expandirem a nível sistêmico, no qual podem atingir órgãos vitais com extensão ao SNC (sistema nervoso central). Apesar da existência de tratamentos efetivos para PCM, a natureza polimórfica das lesões anteriores ao diagnóstico resulta em doença progressiva que aumentam a disponibilidade ou deixam seqüelas.

Neste contexto, está clara a necessidade do desenvolvimento de novas drogas que sejam efetivas no controle desta micose, sem causar efeitos colaterais ou diminuir a ocorrência destes, e sem gerar recidivas do processo infeccioso.



## II- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- Paracoccidioidomicose

As infecções profundas por fungos podem ser divididas em micoses subcutâneas e sistêmicas. As micoses subcutâneas representam um grupo heterogêneo de infecções resultantes da penetração direta do fungo na pele através de um trauma, com invasão e infecção do local e tecido adjacente, raramente culminando em disseminação sistêmica (SILVA *et al.*, 2007). Em casos onde há disseminação sistêmica ela ocorre através da via hematogênica (RIVITTI *et al.*, 1999) no qual a imunossupressão é um fator de risco para o desenvolvimento destas infecções (PANG *et al.*, 2004).

Em indivíduos que têm, ou mesmo em indivíduos que não têm a imunidade comprometida, há a ocorrência de micoses sistêmicas que são causadas pela elevada patogenicidade do fungo. A infecção se dá através da inoculação de pequenas partículas do microrganismo (pequenos fragmentos de hifas) usualmente através do trato respiratório. Partindo deste pressuposto, os fungos podem se disseminar no organismo via hematogênica, e, eventualmente via sistema linfático, alcançando a pele e outros órgãos diversos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Dentre as micoses sistêmicas e endêmicas destaca-se a paracoccidioidomicose (PCM) que é de grande interesse para os países da América Latina e é causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Apresenta distribuição heterogênea, havendo áreas de baixa e alta endemicidade. No adulto a forma clínica predominante é a crônica, mas quando acomete crianças ou adolescentes apresenta-se na forma aguda ou subaguda. Quando não diagnosticada e tratada oportunamente, pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e outros órgãos linfóides do tubo digestivo (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

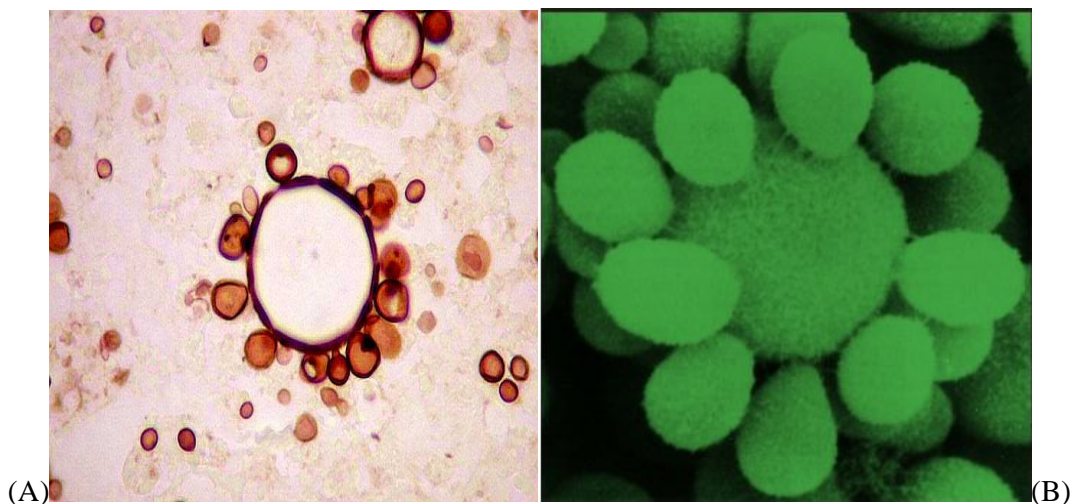
Esta micose representa um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca, principalmente para segmentos sociais específicos, como os trabalhadores rurais, que além de tudo isso apresentam grandes deficiências de acesso e suporte de rede dos serviços de saúde favorecendo o diagnóstico tardio. Os indivíduos acometidos pela micose, em sua maioria,

encontram-se na fase mais produtiva da vida entre 30 e 50 anos em sua maioria do sexo masculino, levando o acometimento da doença um grande impacto social e econômico. (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A micose tem distribuição geográfica restrita ao continente americano, sendo circunscrita aos países latino-americanos, situados entre 23° de latitude norte e 34,5° de latitude sul, desde o México até a Argentina (FILHO *et al.*, 2000). No entanto, foram relatados casos na Guatemala, Belize, US, Europa e Japão (SILVA *et al.*, 2008). Embora sejam conhecidos fatores climáticos e fisiográficos das áreas endêmicas em alguns países, ainda não foi possível a delimitação exata destas áreas, porque muitos dados sobre a ecologia do PCM continuam no terreno das hipóteses (FILHO *et al.*, 2000). Estudos utilizando técnicas moleculares em conjunto com a bioinformática demonstram que *Paracoccidioides brasiliensis* pertence ao filo Ascomycota, ordem Onygenales, ficando sua atual classificação como descrita a seguir (BAGAGLI, *et al.*, 2006):

Divisão – Eukaryota  
Reino – Fungi  
Filo – Ascomycota  
Classe - Plectomycetes  
Ordem – Onygenales  
Família – Onygenaceae  
Gênero – *Paracoccidioides*  
Espécie – *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis*, como relatado, exhibe dimorfismo térmico. No meio ambiente apresenta-se sob a forma de micélio (forma saprofítica). No homem, o parasita tem aspecto bastante característico: células arredondadas, de dupla parede refringente, com ou sem gemulação simples ou múltipla, de 1µm a 30µm no seu maior diâmetro. A esporulação múltipla é patognomônica e se faz através da formação de cromídios na periferia do citoplasma, que depois atravessam pequenos pertuitos da parede celular, arrastando consigo porção de massa citoplasmática e a membrana envolvente; o aspecto resultante é a figura típica em “roda de leme” demonstrada a seguir (FILHO *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Infiltrado crônico-granulomatoso, com estrutura fúngica em germinação. A) Imagem por microscopia eletrônica B) Imagem por microscopia de varredura. **Fonte:** [www.sbi.org.br/pbmicoso2005](http://www.sbi.org.br/pbmicoso2005).

A forma micelial é encontrada na natureza a temperatura de 25° C, produzindo pequenas colônias crescentes (3-4 semanas) (MARQUES, 1998), e para se estabelecer e multiplicar nos tecidos humanos o fungo tem de se adaptar a temperatura de 37° C, assumindo a forma leveduriforme (FILHO *et al.*, 2000). Recentemente descobriu-se que o fungo apresenta receptores para estrógenos e que, os hormônios femininos são capazes de inibir *in vitro* a transformação da fase micelial dos conídios para a fase leveduriforme; este mecanismo justifica a conhecida resistência das mulheres à micose (FILHO *et al.*, 2000).

Até recentemente, os humanos eram considerados os únicos hospedeiros naturalmente infectados por este fungo. No entanto existem relatos na literatura de que outros animais foram encontrados portadores da infecção como o tatu e o cão (EISELE *et al.*, 2004).

O habitat do *Paracoccidioides brasiliensis* não parece ser o homem nem os animais que o circundam, mas sim o solo das regiões endêmicas (FILHO *et al.*, 2000). O grande fator de risco para aquisição da infecção são as profissões ou atividades relacionadas com o manejo do solo contaminado com o fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, terraplenagem, preparo do solo, práticas de jardinagem, transporte de produtos vegetais entre outros (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Fatores hormonais, genéticos, imunológicos e nutricionais estão envolvidos no desenvolvimento da infecção e da patologia (ALMEIDA *et al.*, 2003). Uma vez adquirida, a imunidade do hospedeiro é determinante para extensão e gravidade da doença (SILVA *et al.*, 2004).

A depressão das células T e a severidade da doença estão relacionadas. A resposta THs padrão é prevalente na fase inicial da infecção, refletindo na ativação e diferenciação de linfócitos B por plasmócitos e um aumento na secreção de imunoglobulina (SILVA, 2007). Em pacientes que possuem a forma disseminada e crônica da PCM foram encontrados altos níveis de fatores tumorais necrosantes (TNF), interleucina (IL) – 1, IL -6, e altos níveis de anticorpos, porém IL – 4 normal (MARQUES *et al.*, 1998).

Altas doses específicas de anticorpos contra *Paracoccidioides brasiliensis* têm relação direta com a gravidade das formas clínicas, estando mais altas nas formas agudas/subagudas da doença (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Em contato com os tecidos, os fungos podem ser imediatamente distribuídos ou superar as defesas locais do hospedeiro passando, a multiplicar-se e causando as alterações iniciais como lesões de inoculação e linfática, que formam o complexo primário. As lesões do complexo primário podem: 1) regredir com a destruição dos fungos e formação de cicatrizes estéreis; 2) regredir com a permanência de fungos viáveis no interior das cicatrizes (focos queiscentes); 3) progredir determinando o aparecimento de sinais e sintomas (SILVA *et al.*, 2000).

Para SHIKANAI-YASUDA (2006) as formas de apresentação da PCM podem ser assim classificadas:

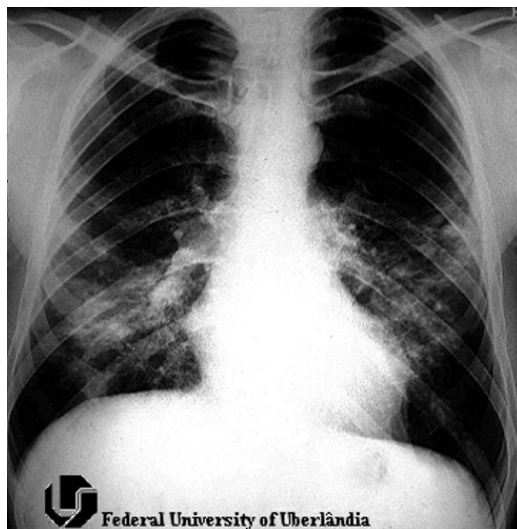
- PCM infecção;
- PCM doença;
- Forma aguda / subaguda;
- Forma crônica;
- Unifocal;
- Multifocal;
- Forma residual ou seqüela

A forma aguda do tipo juvenil é responsável por cerca de 5% da doença até 14 anos. Caracteriza-se por evolução rápida com envolvimento de linfonodos, baço, fígado, medula óssea e lesões cutâneas. Geralmente, ocorre febre persistente e perda de peso. Os achados de lesões pulmonares nesta fase são raros, porém, em secreções pulmonares é possível encontrar os fungos (CARVALHO *et al*, 2006).



**Figura 2.** Lesão granulomatosa envolvendo o nariz através de disseminação por vias aéreas. **Fonte:** [www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org)

A forma crônica ou tipo adulto ocorre principalmente em adolescentes acima de 15 anos e adultos, com manifestações pulmonares em 90% dos pacientes. Estes podem apresentar febre, perda de peso, tosse produtiva, acompanhada de crescente dispnéia. A expectoração em geral tem aspecto mucoso, mas pode apresentar-se hemoptótica. No entanto, o comprometimento pulmonar pode ser assintomático, mesmo na presença lesões extensas. São visualizados na radiografia de tórax caracterizando dissociação clínico-radiológica. (CARVALHO *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Radiograma em frontal do tórax demonstrando área de infiltração com atelectasia subsegmentar e mínimas áreas de consolidações no terço inferior do pulmão. **Fonte:** <http://www.radiology.co.uk/srs-x/cases/088/d.ht>

O diagnóstico é feito através do isolamento e identificação do fungo, por exame microbiológico direto através da examinação histopatológica, citopatológica, citológica e também por segmentos sorológicos (SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006). O método mais barato e simples é o exame micológico direto do material obtido por lesões cutâneas ou em mucosas, aspiração do nódulo linfático, abscesso ou líquido sinovial. Germulações múltiplas ou simples são observadas no exame histopatológico direto, por microscopia, sendo os meios de cultura mais usados *Sabouraud's dextrose* Agar e Agar sangue (RAMOS e SILVA, 2004). Os testes sorológicos como fixação de complemento, imunodifusão e ELISA podem ser utilizados com sensibilidade e especificidade diversos (CARVALHO *et al.*, 2006).

A cura espontânea não é vista com frequência, exceto em casos de infecção pulmonar primária (MIYAJI *et al*, 2003). Na maioria dos casos onde é confirmada a micose, os pacientes são submetidos ao tratamento. Apesar da existência de tratamentos efetivos para PCM, a natureza polimórfica das lesões anteriores ao diagnóstico resulta em doença progressiva que possibilitam ou deixam seqüelas (RESTREPO, 1994).

O fungo apresenta características de resistência que o protege contra ação do sistema imunitário (atividade de células fagocíticas), e também aumenta sua resistência à drogas. SILVA *et al.* (2008) identifica a produção de melanina na presença de I-DOPA *in vitro*, como um fator indutivo.

A PCM é caracterizada por sua cronicidade, e pela severidade em que tem se disseminado em indivíduos saudáveis e também em indivíduos imunologicamente comprometidos, como por exemplo indivíduos portadores de HIV no qual vem conduzindo uma taxa de mortalidade na escala de 30-45%. A longa duração do tratamento (vários anos) é resultante da imunossupressão induzida pela doença ou da capacidade da sobrevivência do fungo no tecido. Alguns estudos controlados e casos reportados têm mostrado que os derivados azólicos e as sulfas são úteis no tratamento alternativo em pacientes que apresentem esta condição de doença. Entretanto, ao usar tais drogas, regimes de tratamento de duração mais longa são exigidos para manutenção dos pacientes portadores de formas mais severas. A busca de novas alternativas para tratamento dos casos mais severos é um desafio em curso. Os tratamentos novos podem ser encontrados entre classes novas de drogas, combinações de drogas, ou agentes capazes de modular resposta imune, tal como o peptídeo derivado da glicoproteína 43-kDA do *P. brasiliensis* (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2005).

Apesar da limitação das informações disponíveis com estudos comparativos com diferentes esquemas terapêuticos, as drogas clássicas usadas para o tratamento de PCM são as sulfonamidas (sulfametoxazol + trimetropim), Anfotericina B, derivados imidazólicos como Cetoconazol, Traconazol e Fluconazol. Voriconazol, um novo antifúngico triazólico de segunda geração, disponível em apresentações oral e intravenosa, constitui uma importante alternativa terapêutica, especialmente em casos de neuroparacoccidiodomicose (NPCM), devido à boa penetração no sistema nervoso central. No entanto, o custo alto é uma importante limitação para o uso (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber Anfotericina B ou associação sulfametoxazol + trimetropim por via intravenosa (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Porém, o uso de Anfotericina B é limitado devido às frequentes reações adversas que promove e à nefrotoxicidade intensa (ÁVILA *et al.*, 2004). Esta situação aumenta a necessidade para a busca de novos compostos antifúngicos efetivos (JOHANN *et al.*, 2007).

Estudos recentes sobre a imunidade de *Paracoccidioides brasiliensis* revelam que o flagelo FliC de *Salmonella enterica* modula a resposta imune ao antígeno P10 do *P. brasiliensis* e representa uma alternativa promissora para a geração das vacinas anti-PCM (BRAGA *et al.*, 2009), o que nos abre portas para outras possíveis formas de erradicação.

## 2.2- Plantas Medicinais

Apesar dos grandes avanços na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda proporcionam uma contribuição importante a terapia médica. O crescimento no mercado de fitoterápicos mundial ocorreu durante os últimos 15 anos (CALIXTO *et al.*, 2000). Todo este reconhecimento parte da capacidade das plantas em fornecer diversidade e bioatividade químicas, que conduzem ao desenvolvimento de centenas de drogas farmacêuticas. Os produtos naturais apresentam uma fonte incomparável de diversidade molecular para a descoberta e o desenvolvimento de drogas (SHU, 1998). No entanto, é falsa a ideia de que as drogas herbais estão seguras e livres dos efeitos secundários. As plantas contêm centenas de componentes químicos e alguns deles são muito tóxicos (CALIXTO *et al.*, 2000). No geral, as plantas medicinais são distribuídas no mundo inteiro, mas são mais numerosas em países tropicais como o Brasil (LUIZE *et al.*, 2006).

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura, dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações:

- a) abordagem randômica - escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta;
- b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética - seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família;
- c) abordagem etnofarmacológica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (MACIEL *et al.*, 2002).

De acordo com MACIEL, *et al* (2002), as probabilidades de novas descobertas de substâncias inéditas, bioativas ou não, é, sem dúvida, maior na seleção randômica. De acordo com esta abordagem 10000 diferentes tipos de plantas simbolizam de 50.000 a 100.000 possibilidades estruturais de produtos naturais.

A seleção etnofarmacológica, no entanto, favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas. Nesta abordagem as plantas medicinais são consideradas não apenas como simples matéria prima. A descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico, se traduz



na economia de tempo e dinheiro, dois dos fatores mais perseguidos pelas economias ocidentais.

No presente estudo, a seleção dos extratos foi realizada de forma randômica, uma vez que foram analisadas a disponibilidade e quantidade suficiente para realização dos testes e também por abordagem etnofarmacológica, baseada em estudos feitos por JOHANN (2008), que testou a atividade dos extratos contra o fungo *P. brasiliensis* com resultados satisfatórios.

### **2.2.1- *Baccharis dracunculifolia***

A *Baccharis dracunculifolia*, nativa do Brasil, também conhecida pelo nome popular de vassourinha devido a seu uso na produção de vassouras, foi considerada uma planta invasora de pastagens e erradicada de muitas regiões em função disto. Atualmente sabe-se que é através da coleta da resina produzida por esta planta, que as abelhas produzem própolis verde. As mudas podem ser produzidas através de sementes. Também se dissemina por auto-propagação (CARNEIRO *et al.*, 1996).

*Baccharis* é um importante gênero pertencente à família *Asteraceae* e possui aproximadamente 500 espécies distribuídas principalmente da região Sudoeste ao Sul do Brasil, estendendo-se até a Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (DEWICK, 1997).

Muitos trabalhos se detêm no isolamento de substâncias de representantes desse gênero (BUDEL *et al.*, 2004). Os tricotecenos, produzidos por algumas espécies de *Baccharis* em simbiose com os fungos *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium* e *Trichoderma*, têm tido uma atenção especial por sua relevância no combate ao câncer. A bacarina, tricoteceno extraído de *B. megapotamica* Spreng, atua contra leucemia e tumores do cólon em camundongos (CARNEIRO M. A. A. *et al.* 1996).

Partindo deste pressuposto, esta espécie passa a ter interesse mundial, pois fornece material às abelhas na produção da própolis verde, composto que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas e biológicas, destacando a atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e antiinflamatória, prevenindo o aparecimento de doenças (MARCHESAN, *et al.*, 2006).



Figura 4: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Alecrim-do-campo>

### **2.2.2- *Inga dulcis***

*Inga dulcis* é uma árvore nativa dos trópicos americanos de crescimento rápido e tamanho médio. Tem sido usada extensivamente para reflorestamento, propósitos ornamentais e para a produção de lenha, forragem e numerosos outros produtos (PARROTTA, 1991).

É uma planta muito comum na América Latina e em algumas regiões da Ásia e da África onde é utilizada para a recuperação de áreas desertas. Em locais arenosos como no sul da Índia, a árvore é utilizada como uma proteção contra fungos patogênicos (PARROTTA, 1991).

O ingá é sabiamente utilizado no México e na Ásia como uma fonte numerosa de produtos medicinais. Entre os indianos, os extratos da árvore são usados para tratamento de algias e úlceras. A casca é usada como agente antipirético, no entanto sabe-se que possui propriedades irritantes que podem causar infecções nos olhos e lesão nas pálpebras. Em relação ao extrato dos galhos do ingá, foi relatada na Índia uma atividade eficaz contra o vírus mosaico do tabaco (PARROTTA, 1991).

### **2.2.3- *Piper regnellii***

Dentre as espécies empregadas para fins terapêuticos, destaca-se a *Piper regnellii*, conhecida popularmente por pariparoba, caapeba e capeba. Suas raízes são utilizadas no tratamento das obstruções do fígado e do baço, para cicatrização de feridas, redução de inchaços, irritações na pele e também por apresentar atividade analgésica (CAMINHOA, 1978).

*Piper regnellii* é um arbusto de aproximadamente 1,5m de altura, de caules perfilados, cilíndricos, de aspecto liso, nodoso de coloração verde e verde claro, com regiões mais jovens pubescentes e apresentando ramificação simpodial (PESSINI, 2003).

SALATINO e SILVA (1975) citam que os trabalhos publicados na mesma data, relatavam análise de substâncias ativas de *P. regnellii*, e concluem que elevada porcentagem destas drogas eram adulteradas ou completamente falsificadas, pela origem duvidosa das amostras estudadas, sendo necessários estudos anatômicos para aprimorar a identificação e detecção de falsificações.

HOLETZ *et al.* (2002) selecionaram 13 plantas medicinais brasileiras, e dentre estas plantas relatou atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico das folhas do *P. regnellii* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e também contra as leveduras *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Varias espécies de *Piper* têm mostrado uma interessante atividade biológica. Estudos fitoquímicos da raiz da planta e sua atividade demonstram capacidade antifúngica e inseticida (LUIZE *et al.*, 2006).

### **2.3- A busca de novos compostos antifúngicos**

As drogas antifúngicas são classificadas em agentes químicos clássicos e atuais e em antibióticos. Os agentes clássicos são aqueles medicamentos que apresentam, de maneira geral, espectro de ação reduzido contra fungos, atuando como fungistático de modo indireto ao modificar as condições locais, como, por exemplo, o iodo, os ácidos graxos e derivados, ácido salicílico, tolnaftato e tolclano. Os agentes químicos atuais são representados pelos imidazólicos e triazóis, flucitocina e alinaminas e os antibióticos poliênicos (anfotericina B, nistatina, natamicina) e a griseofulvina (NOBRE, 2002).

Contrariamente ao ocorrido com a terapêutica bacteriana, os avanços no tratamento das enfermidades micóticas têm sido lentos, apesar de que durante as últimas décadas a frequência de infecções fúngicas têm aumentado drasticamente. Os fatores que têm contribuído para este fato são os seguintes:

- a) o aumento da população de imunossuprimidos, tais como pacientes com SIDA, câncer e transplantados;
- b) a utilização de procedimentos médicos mais agressivos (próteses e cateteres de diversos tipos);
- c) o tratamento com antibióticos de amplo espectro;
- d) a ampla utilização de nutrição parenteral e diálise (VICENT *et al.*, 2007).

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis. Como consequência das infecções por fungos representarem o parasitismo de um organismo eucariótico sobre um outro eucariótico (homem e animal), com diferenças fisiológicas muito pequenas, quando comparado a infecções bacterianas, é necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (LACAZ & NEGRO, 1991; ALVES *et al.*, 1999). As drogas antifúngicas exercem ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente. Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (LACAZ & NEGRO, 1991). Nos últimos 10 anos, o uso de novas e mais efetivas drogas (antibacterianas e imunossupressoras) aumentaram a sobrevivência dos pacientes, porém tornaram estes organismos mais suscetíveis às infecções micóticas (ALVES, *et al.*, 1999).

Apesar da existência de cinco classes de drogas antifúngicas disponíveis no mercado, todas elas têm sérias desvantagens: algumas não possuem amplos espectros de ação, outras são seletivas para o microrganismo sendo tóxicas para o hospedeiro e muitas são fungistáticas e não fungicidas podendo promover recidivas. A isto acrescenta a aparição de isolados resistentes aos antifúngicos de uso clínico, que é atualmente um problema de difícil solução (ZACCHINO *et al.*, 2007).

Desta forma o número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. Nos últimos anos, a Anfotericina B e os azóis (principalmente Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol) têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos. Os

polienos ligam-se a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana, que permite o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular (GRAYBILL, 1996). A metabolização dos azóis é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico (ARENAS, 1993).

A Anfotericina B, por exemplo, é um antibiótico fungicida de largo espectro e potente, sendo o mais utilizado pelos sistemas de saúde, mas seu uso é associado a efeitos adversos significativos, como nefrotoxicidade e febre com calafrios, como reação aguda à infusão intravenosa. Uma vez que a farmacocinética deste fármaco não permite a administração oral (GOODMAN & GILMAN, 1996), a internação do usuário é necessária para administração endovenosa, fato este, que implica em um aumento na susceptibilidade de ações/reações iatrogênicas, gerando mais risco e desconforto para o paciente. Novas formulações da Anfotericina B, na forma de lipossomas e de dispersão coloidal, produzem menos efeitos colaterais, como resultado da redistribuição do fármaco nos tecidos e da seletividade de liberação, mas o preço destas formulações é muitas vezes maior que o das antigas (GRAYBILL, 1996).

Os azóis são antimicóticos, químicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e bolores, apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. A ação fungistática ou fungicida é dependente da concentração da droga. Recentemente os triazólicos têm recebido maior destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, ambos com largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos. Pela sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Candida* (LACAZ & NEGRO, 1991; ARENAS, 1993; ALVES, *et al.*, 1999).

O cetoconazol é indicado em uso tópico ou por via oral, tendo amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas, onde inclui-se a PCM. A distribuição do cetoconazol é limitada e sua penetração no líquido cefalorraquidiano é mínima. A resposta ao tratamento oral é relativamente lenta, sendo menos útil em infecções graves e agudas. A atividade antimicótica do cetoconazol frente aos fungos *Coccidioides*

*immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* é atingida em concentrações de 0,125µg/mL até 0,5µg/mL. Os valores correspondentes para *Sporothrix schenckii*, *Candida sp.* e *Aspergillus sp.* variam entre 6µg/mL até concentrações iguais ou maiores que 100 µg/mL (LACAZ & NEGRO, 1991).

O fluconazol é um antifúngico triazólico, que age na inibição da síntese de esteróide fúngico e praticamente não altera a síntese do ergosterol dos mamíferos, sendo menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis. Este antifúngico tem sido utilizado rotineiramente em pacientes com micoses superficiais e sistêmicas, levando a problemas de resistência de cepas fúngicas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, portadores de candidose principalmente por *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (FAVEL *et al.*, 1995).

A conjugação de alguns fatores como o crescente interesse por medicamentos oriundos de plantas medicinais, a potencialidade da biodiversidade brasileira e a capacidade científica e tecnológica do país têm estimulado a pesquisa em plantas medicinais. O governo federal tem estabelecido ações voltadas para o uso sustentável da biodiversidade incentivando o convênio entre instituições de ensino/pesquisa e o setor produtivo de bens e serviços. Na realidade produtos naturais obtidos de plantas medicinais têm sido utilizados como matéria-prima para síntese de novos fármacos, ou constituem fontes de modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Dentre as atividades biológicas e farmacológicas apresentadas por vários metabólitos secundários, há um grande estímulo para a procura de substâncias antifúngicas a partir de extratos vegetais, tendo em vista o aumento das infecções fúngicas humanas como resultado das imunodeficiências associadas com a AIDS e processos quimioterápicos (SARTORELLI, 2005).

Por todas estas razões, existe um consenso geral de que são necessárias novas drogas com atividades antifúngicas, aos quais possam constituir alternativas para o tratamento das infecções fúngicas (ZACCHINO *et al.*, 2007).

### III- OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo a busca de novos compostos antifúngicos com atividade contra *Paracoccidioides brasiliensis* a partir do extrato de três plantas: *Inga dulcis*, *Baccharis dracunculifolia* e *Piper regnellii*.

Os objetivos específicos se resumem em:

- Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra 10 isolados clínicos de *P. brasiliensis*;
- Teste da Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra 10 isolados de *P. brasiliensis*;

## **IV- METODOLOGIA**

Os dados a seguir são representativos para os extratos das plantas testadas: 1) *Inga dulcis*: extrato diclorometano das folhas; 2) *Piper regnellii* extrato diclorometano das folhas; 3) *Baccharis dracunculifolia* extrato hexânico das folhas, flores e caule. Os extratos foram previamente selecionados, particionados por Johann e colaboradores (2008) e gentilmente disponibilizados para o presente trabalho.

### **4.1 - Meios de cultura**

Para a manutenção das culturas, e para o teste de atividade fungicida, foi utilizado o meio YPD (Yeast Peptona Dextrose) como fonte de carbono, nitrogênio, vitamina e minerais, composto por extrato de levedura (10g/l), peptona (20g/l), dextrose (20g/l) e Agar (15g/l). Para o teste de microdiluição foi utilizado o meio RPMI 1640 (Sigma) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (Sigma).

### **4.2 - Preparo do Inóculo**

Os 10 isolados de *P. brasiliensis* utilizados (PB01, PB18, ED01, 1578, 1925, PB339, PB608, 470, ED04 e 1017) pertencem à coleção de fungos do laboratório de Biologia dos Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e suas características estão descritas na Tabela 1. As amostras foram mantidas em meio sólido YPD e incubadas a 37°C para se obter a fase de levedura. Foram realizados repiques semanais com o objetivo de manter as amostras viáveis. As células leveduriformes foram coletadas assepticamente com alça de Henle e suspensas em 3ml de salina, o inóculo foi homogeneizado em vortex e a transmitância medida com comprimento de onda de 520nm foi ajustada para 70%. Posteriormente foi feita uma diluição de 1:10 em meio RPMI.



**Tabela 1.** Os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e suas características

<b>Isolados</b>	<b>Fonte / origem geográfica</b>
PB01	ATCC-MYA-826 / Goiás
PB18	PCM crônica / São Paulo
ED01	Isolado clínico / Goiás
1578	Isolado clínico / Goiás
B339	PCM crônica / Brasil
1925	PCM crônica / Venezuela
470	PCM aguda / São Paulo
Mg5	PCM aguda / Paraná
1017	PCM crônica / São Paulo
PB608	PCM crônica / São Paulo

#### **4.3 – Testes de susceptibilidade antifúngica**

Ambos os testes foram executados de acordo com o *guidelines* presente no documento CLSI M27-A2 com as modificações propostas por Johann *et al*, 2007. A concentração final do agente antifúngico foi de 7,8 a 1000 µg/ml como descrito com mais detalhes a seguir.

##### **4.3.1 - Método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Primeiramente, os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio RPMI, onde foi mantido o volume constante de 1000µl em cada tubo e testados em 8 concentrações (7,8µg/ml - 1000µg/ml) (JOHANN *et al.*, 2007). De cada diluição, alíquotas de 100 µl foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o RPMI sem a adição do extrato e solvente. Como controle de toxidez do solvente foi usado o meio de cultura juntamente com o DMSO.

Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento receberam 100µL do inóculo microbiano. As placas foram incubadas e lidas após sete a 14 dias após a inoculação à temperatura de 37° C. As CIMs foram consideradas como a menor concentração do produto natural que inibiu totalmente o crescimento do microrganismo, em relação ao controle de crescimento, após a incubação e foram expressas em µg/ml (Tabela 1).

#### ***4.3.2 - Método de microdiluição para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)***

A análise fungicida foi realizada através da inoculação de amostras provenientes dos poços dos extratos das três plantas onde não ocorreu o crescimento do fungo, em placas de petri contendo o meio YPD. Após a inoculação as placas foram condicionadas a 37°C por sete dias. Os resultados obtidos foram expressos em µg/ml (Tabela 2). A leitura destes resultados foi obtida pela análise das placas, tendo como resultado positivo a ausência do crescimento do fungo.

## V- RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho foram estudadas três plantas da medicina popular. Trabalhos semelhantes têm sido utilizados por outros autores com diversas outras espécies, demonstrando o potencial das plantas medicinais para a busca de novas substâncias bioativas.

No teste de análise da atividade antifúngica observou-se que os extratos das três plantas utilizadas exibiram atividade contra todos os isolados de *P. brasiliensis* testados. Destes extratos, as frações obtidas a partir do particionamento *B. dracunculifolia* (hexano), e de *P. regnellii* (diclorometano) apresentaram os melhores resultados, apresentando baixas Concentrações Inibitórias Mínimas. Já o extrato das folhas de *I. dulcis* não apresentou grande potencial antifúngico.

No presente trabalho as frações hexânicas de *B. dracunculifolia* e *P. regnellii* mostraram valores de CIM variáveis entre 7,8125µg/mL a 31,25µg/mL. Sendo que *B. dracunculifolia* apresentou maior atividade contra os isolados B339 e 1925 na concentração de apenas 7,8125µg/mL e *P. regnellii* contra os isolados 470, 1017 e PB608 na mesma concentração. Já para fração hexânica de *I. dulcis* foram necessárias concentrações maiores que 31,25µg/mL para inibir o crescimento de todos os fungos testados. Estes resultados foram parecidos com os encontrados por JOHANNN *et al.* (2008), onde foram testados somente os isolados PB18, PB01 e B339.

Vários autores citam a atividade antimicrobiana de plantas do gênero Piper (LOCHER *et al.*, 1995; LOPES *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2004; HOLETZ *et al.*, 2002; LAGO *et al.*, 2005). HOLETZ, *et al.* (2002) tem mostrado em estudos que os extratos de *P. regnellii* não apresentam potencial para inibição de *C. albicans*, contrariamente a PESSINI *et al.* (2005) que observou resultados significativos contra o fungo, e moderada atividade contra *C. krusei*. Neste trabalho, foi confirmada a atividade antifúngica desta planta contra o *P. brasiliensis*, no entanto são necessários mais estudos a fim de se isolar e identificar o princípio ativo desta planta.

No teste de CFM, *B. dracunculifolia* apresentou o melhor resultando de atividade fungicida contra os isolados B339 e 1925 na concentração de 7,8125 µg/mL. O extrato das folhas de *B.*

*dracunculifolia*, foi reportado por SILVA *et al.* (2004), com propriedades ativas contra *Streptococcus mutans*. De acordo com SANTOS *et al.* (1996), nerolidol é o maior constituinte do óleo de *B. dracunculifolia*, no entanto, o extrato hexânico das folhas galhos e flores apresenta somente 6,3% desta substância (JOHANN, 2008). Este fato pode ser explicado pelo tipo de material utilizado para a produção dos extratos, que induzem a atividade de substâncias mais apolares, no caso do uso de hexano, ou de substâncias mais polares.

De um modo geral, os compostos que mais se destacam com atividade antimicrobiana do gênero *Baccharis* são os flavonóides, os clerodanos e os labdanos, embora também se tenha observado com certa frequência a presença de cauranos, triterpenos, germacreno, ácidos cumáricos, tricotecenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (VERDI *et al.*, 2005). Em *B. dracunculifolia* foi descrita ainda a presença de flavonas, como a 8-OH flavona e a 3,5,7-OH 6,4'-OME flavona (bubuletol) (KUMAZAWA *et al.*, 2003). No trabalho de Johann 2007, através da análise por CG-SEM da fração hexânica desta planta, foram encontradas diversas substâncias voláteis, como os sesquiterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ - farneseno, maiurona, isocriofileno e nerolidol. Estas substâncias podem ser responsáveis pela atividade antifúngica da fração hexânica de *B. dracunculifolia* contra os isolados clínicos testados no presente trabalho de *P. brasiliensis*, uma vez que os terpenóides são conhecidos por apresentarem efetiva atividade antimicrobiana (NICOLETTI, 2002; FERESIN *et al.*, 2003). No entanto para melhores resultados, é necessária a purificação dos compostos presentes na fração hexânica para testes contra *P. brasiliensis*, para verificar qual componente é responsável pela inibição encontrada (JOHANN, 2007).

O extrato que expressou menor atividade contra os isolados foi o de *Inga dulcis*, que apresentou resultados fungicidas e fungistáticos, somente nas concentrações acima de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  sendo necessária a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  para atividade fungicida contra os isolados PB01 e PB18.

Muito pouco tem-se relatado sobre atividade antimicrobiana de *I. dulcis*. A falta de interesse por esta espécie supostamente se deve ao fato de ela não apresentar atividade antifúngica contra fungos de importância clínica, geralmente utilizados em trabalhos de triagem, como as espécies oportunistas de *Candida*. No presente trabalho, o extrato desta planta foi ativo contra

*P. brasiliensis* como demonstrado anteriormente, e esta espécie de fungo geralmente não é utilizada nos trabalhos de triagem da atividade antifúngica.

O fungo *P. brasiliensis*, causados de paracoccidiodomicose, é sensível a diversos antifúngicos comerciais, mas o tratamento é demorado, o que pode afetar a função renal ou trazer graves reações de hipersensibilidade ao paciente. Os azólicos também podem ser utilizados no tratamento da PCM, podendo deter a progressão da doença, mas a seqüela fibrótica e o granuloma persistem, provavelmente constituindo recurso para o *P. brasiliensis* causar uma recidiva da doença após o término do tratamento. Desta forma, observa-se que é grande a necessidade de novas e mais efetivas drogas para o tratamento da PCM. Os resultados obtidos através dos extratos de *B. dracunculifolia*, *I. dulcis* e de *P. regnellii*, mostram ser promissores na busca de substâncias ativas contra este fungo.

Entre os isolados de *P. brasiliensis* estudados o mais resistente contra os extratos foi o PB01, que exigiu concentrações de 31,25 a 250 µg/mL para ação fungicida e fungistática. E os mais sensíveis foram B339 e 1925 que exigiram concentrações de 7,8125 a 31,25 µg/mL para a mesma atividade.

É limitado o número de trabalhos sobre a atividade de produtos naturais contra *P. brasiliensis*, o que torna difícil análise comparativa com outros trabalhos. No entanto, os resultados encontrados expressam resultados similares aos encontrados por JOHANN (2008).

**Tabela 2. Concentração inibitória mínima da atividade fungistática dos extratos vegetais contra isolados de *Paracoccidioides brasiliensis***

Isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Inga dulcis</i> Dicloro/Folha	<i>Piper regnellii</i> Dicloro/ Folha	<i>Baccharis dracunculifolia</i> Hexano/ Mistura Folhas, caule e flores
PB01	250	31,25	31,25
PB18	125	15,625	31,25
ED01	62,5	31,25	15,625
1578	31,25	15,625	15,625
B339	31,25	15,625	7,8125
1925	31,25	15,625	7,8125
470	62,5	7,8125	15,625
ED04	31,25	31,25	15,625
1017	125	7,8125	31,25
PB608	31,25	7,8125	15,625

Resultados expressos em µg/mL

**Tabela 3. Concentração inibitória mínima da atividade fungicida dos extratos vegetais contra isolados de *Paracoccidioides brasiliensis***

Isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Inga dulcis</i> Dicloro/Folha	<i>Piper regnellii</i> Dicloro/ Folha	<i>Baccharis dracunculifolia</i> Hexano/ Mistura Folhas, caule e flores
PB01	250	62,5	31,25
PB18	250	15,625	31,25
ED01	62,5	31,25	15,625
1578	125	15,625	15,625
B339	31,25	15,625	7,8125
1925	31,25	15,625	7,8125
470	62,5	250	15,625
ED04	31,25	31,25	Não houve crescimento
1017	125	62,5	15,625
PB608	31,25	31,25	15,625

Resultados expressos em µg/mL

## VI- CONCLUSÃO

No presente trabalho, os extratos hexânicos das três plantas testadas, foram capazes de expressar atividade contra 10 isolados de *P. brasiliensis*. As frações de *P. regnellii* e *B. dracunculifolia* foram as mais ativas contra este fungo patogênico.

Neste contexto, seria interessante o isolamento das substâncias, para a identificação dos compostos ativos, seguidos de testes *in vitro* e *in vivo* e estudos de mecanismos da ação.

Os resultados obtidos demonstraram o potencial da flora brasileira na busca de substâncias ativas contra doenças de regiões tropicais e subtropicais e negligenciadas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; CURY, A. E. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar. Disponível *on line* na Internet em 05 de abril de 2008.

<http://www.newslab.com.br/antifung.htm>

ARENAS, R. Micologia medica ilustrada. México : Nueva editorial interamericana, 1993. Cap.34.: Antimicoticos; p.359-376.

BRAGA C. J. M. Paracoccidioides brasiliensis vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the Salmonella enterica FliC flagellin. Infeccion and Imunity. Fev, 2009.

BUDEL J. M., DUARTE M. R., SANTOS C. A., FARAGO P. V., Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. Acta Farm. Bonaerense. v. 23, p 477-83, 2004.

CALIXTO, J. B., Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Journal of Medical and Biological Research Brazilian, v. 33, p 179-189, 2000.

CAMINHOA, J. M. Elementos de botânica geral e medica. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v. 3.

CARNEIRO, M. A. A., FERNANDES G.W. Ciência Hoje v. 20, p 35-9. 1996.

CARVALHO, W. B. Terapia intensiva pediátrica. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p 981-982. 2006.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products. John Wiley, New York. p 182, 2006.

FAVEL, A.; LIEBERMANN, M.; MICHEL-NGUYEN, A., et al. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species: a comparative study of RPMI, high resolution and casitone media. *J Mycol Med*, v.5, p.7-12, 1995.

FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p 1328, 2000.

GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana editores. p.1436, 1996.

GRAYBILL, JR. Lipid Formulations for Amphotericin B: does the emperor need new clothes? *Ann Int Med*. v.124, p.921-923, 1996.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., FILHO, B. P., Screening of some plants used in the Brazilian folk for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p 1027-1031, 2002.

JOHANN, S, et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, p 681-685, 2007

JOHANN, S. et al. Antifungal Activity of Extracts of Some Plants Used in the Brazilian Traditional Medicine against the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Pharmaceuticalbiology*, 2008. In press.

LACAZ, C.S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. *Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo : Savier, Cap.38. p.616-651, 1991.

LUIZE, P. S., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, B. P., CORTEZ, D. A., NAKAMURA, C. Activity of Neolignans Isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull*, v. 29, p 2126—2130, 2006.

MACIEL, M. A et al. *Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares*. *Química nova*, v. 25. São Paulo, 2002.

MARCHESAN, E. D.; FERRONATTO, R.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. Ação dos óleos essenciais produzidos por *baccharis dracunculifolia* D.C. e *baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 63-66, mai./ago. 2006.

MARQUES, SA. Pacococcidioidomicose. An Bras Dermatol 1998; v. 73, p 4555-69.

MARQUES, SA. Pacococcidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. An Brás Dermatol 2003; v. 78, p 135-50.

National Committee for Clinical Laboratory Standarts. 2002 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standart M27-A2. NCCLS, Villanova, PA, USA.

PARROTTA, J. A. *Pithecellobium dulce* (Robx.) Benth: Leguminosae (Mimosoideae). SO-ITF-SM-40, Jan, 1991.

PESSINI, G. L., ABIERO, A. L., MOURAO, K. S., NAKAMURA, C. V., FILHO, B. D. CORTEZ, D. A. Análise Farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: Aspectos Botânicos e Enfoque Físico-químico Preliminar. Lat. Am. J. Pharm, v. 22, p 209-16, 2003.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. Pacococcidioidomycosis. Dermatol Clin; v. 26, p 257-269, 2008.

RESTREPO, A. Treatment of tropical mycoses. J Am Acad Dermatol; v. 31, p 91-102, 1994.

RIVITTI EA, AOKI V. Deep fungal infections in tropical countries. Clin Dermatol 1999; v. 17, p 171-190.

SALATINO, A.; SILVA, J.B. Anatomia e óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *regnellii*. Bolm. Botânica Univ. S. Paulo, v. 3, p 95-106, 1975.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Pharmaceutical Science*. v. 6. p 385-397, 2005.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R.P.; et al. Consenso em Paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*; v. 39, p 297-310, 2006.

SHU, Y. Z.; Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p 1053-1071, 1998.

SILVA, et al. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infeccion*. v. 8, p 197-205, 2008.

VICENTE, M. F.; PELÁEZ, F. Situación actual de la terapia antifúngica. Cap 2, 2007.

ZACHCHINO, S. A. Búsqueda de compuestos antifúngicos. Cap 1, 2007.