

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE *POTHOMORPHE UMBELLATA* FRENTE A  
ALGUMAS LINHAGENS DE DERMATÓFITOS

Edvânio Ramos Rodrigues

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE *POTHOMORPHE UMBELLATA* FRENTE A  
ALGUMAS LINHAGENS DE DERMATÓFITOS

Edvânio Ramos Rodrigues

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e  
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como  
parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências Farmacêuticas.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Araraquara

2012

### Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

R696p

Rodrigues, Edvânio Ramos

Prospecção química e avaliação de atividade biológica de *Pothomorphe Umbellata* frente a algumas linhagens de dermatófitos / Edvânio Ramos Rodrigues. – Araraquara, 2012  
140 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Coorientador: Ana Marisa Fusco Almeida

1. *Pothomorphe umbellata*. 2. *Trichophyton rubrum*. 3. *Trichophyton mentagrophytes*. 4. *Microsporum canis*. 5. Atividade antifúngica. 6. Análise de proteínas fúngicas. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

## **Dedicatória**

**A todos aqueles que veem na ciência não somente um modo de projeção social ou financeira, mas que acreditam nela como ferramenta para a construção de um mundo melhor.**

**A todos que acreditam na educação como forma de melhoria das condições de vida da população.**

**A memória de meus avós, Sr. José Mendes Rodrigues e D. Maria Marquesani, Sr. José Bibiano Ramos e D. Benevenuta Ferreira de Medeiros, pessoas honradas, honestas e trabalhadoras**

### **Agradecimento especial**

**A Profª Drª Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, pela orientação, compreensão e confiança. Por ter acreditado em mim e me oferecido oportunidade de crescimento pessoal e profissional.**

**Que Deus a ilumine e proteja.**

### **Agradecimentos**

A Deus que é amor e sabedora infinita, me que iluminou, deu força e sabedoria. A Nossa Senhora e São José nossos intercessores e advogados junto ao Pai.

A Rozane minha esposa, amiga e companheira, que me apoiou desde o início e a meu filho Gabriel, que mesmo sem saber me dava força para seguir em frente

A meus pais Geraldo Mendes Rodrigues e Nair Medeiros Ramos pelo apoio incondicional.

Aos amigos, Alex, Silvia, Laine, Rosana, Lazaro, Lucia, Vagner e Dirce que entenderam minhas ausências. Obrigado pela força e apoio. Desculpe pelas ausências.

Aos companheiros de Pós-graduação do laboratório de Biotecnologia Farmacêutica. Tatiana, Emerson, que me mostraram os primeiros passos no laboratório e com conselhos, indicaram o caminho a ser seguido. Ao Flávio, pelas conversas, troca de informações e brincadeiras (NOJO). E principalmente a Geisiany (Geisy) pela grande colaboração, apoio nos momentos mais difíceis, conversas valiosas além da troca de informações. Todos vocês me ajudaram a transpor as dificuldades que apareceram no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Rodrigo Sorrechia pela ajuda imprescindível.

Ao Eduardo Santos (Farmacognosia) pela colaboração.

Aos alunos de Iniciação científica do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FCFAR UNESP.

A Profa. Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida, minha co-orientadora, por toda colaboração na parte de análise proteica e discussão.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, do laboratório de Farmacognosia da FCFAR UNESP pela colaboração em toda a parte da fitoquímica e cromatografias, sua ajuda foi muito importante para o bom desenvolvimento do trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lourdes Campaner dos Santos, do Instituto de Química da UNESP Araraquara, pela colaboração na análise de RMN e EM, e aos técnicos do Instituto de Química que colaboraram no trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Helena Januario da UNIFRAN, pela colaboração na realização dos experimentos de cromatografia gasosa.

Ao pessoal do laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da FCFAR-UNESP, principalmente a Pós-graduanda Fernanda Sangalli pela indispensável colaboração na eletroforese bidimensional.

A Profª Dr. Suraia.Said da FCFRP-USP, pela colaboração nos ensaios de parede fúngica.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Sacramento e Angélica pela colaboração na extração do óleo essencial.

A comissão de bolsas do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFAR-UNESP e a CAPES.

Aos professores e colegas do UNIFEG, principalmente a Profª Maria Regina e Prof. Aloisio, pelo apoio e confiança.

Ao Centro Universitário da Fundação educacional Guaxupé-UNIFEG, na pessoa do Pró-reitor acadêmico Prof. José Lazaro pelo apoio.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.



## Resumo

Dermatófitos são um grupo especial de fungos que afetam tecidos queratinizados de humanos e outros vertebrados causando infecções superficiais. O crescimento na incidência dessas infecções tem gerado problemas na terapêutica. A disponibilidade de antifúngicos na prática médica é relativamente pequena, algumas vezes ineficiente e a maioria deles apresenta certa toxicidade. Além do crescimento das infecções fúngicas o problema da resistência microbiana também sofreu um aumento acentuado. Plantas medicinais têm sido usadas por vários propósitos incluindo efeitos antimicrobianos e podem apresentar inibição do crescimento de fungos. *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., planta própria da flora Brasileira, conhecida popularmente como pariparoba ou caapeba, apresenta entre seus constituintes, sitosterol, estigmasterol, 4-nerolidilcatecol (4-NC) e sesquiterpenos. Neste trabalho estudamos a ação antifúngica dos extratos e óleos essenciais de *P. umbellata* além de alterações ocorridas no fungo relacionadas à ação do extrato vegetal, frente a linhagens de *Trichophyton rubrum* (Tr1 e Tr FOC), *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. Os resultados demonstraram boa ação para a fração hexano (FHex) do extrato etanólico com CIM de 9,76 µg/mL e do 4-nerolidilcatecol com CIM de 31,25 µg/mL frente à linhagem Tr1. O teste de citotoxicidade *in vitro* demonstrou um IC<sub>50</sub> de 40,05 µg/mL para a fração hexano e <15,625 µg/mL para o 4-NC frente a linhagem de macrófagos J774. A dosagem do ergosterol fúngico demonstrou diminuição da porcentagem frente a fração FHex para as linhagens Tr1 e Mc, demonstrando um possível mecanismo de ação sobre lipídios. Através da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi demonstrado diferenças

no perfil proteico nas linhagens Tr1 e Mc quando tratada com FHex em comparação com o controle. A análise do perfil proteico através de eletroforese bi dimensional (2D) demonstrou diferenças na expressão de algumas proteínas, em especial proteinases que podem influenciar na infecção fúngica. Alterações também foram evidenciadas em relação ao desenvolvimento de hifas e esporos.

Palavras-chave: *Pothomorphe umbellata*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, atividade antifúngica, análise de proteínas fúngicas

## Abstract

Dermatophytes are a special group of fungi that affect keratinized tissues of humans and other vertebrates causing superficial infections. Growth in the incidence of these infections has generated problems in therapy. The availability of antifungal agents in clinical practice is relatively small, sometimes inefficient and most of them have some toxicity. Besides the growth of fungal infections, the problem of microbial resistance has also shown a significant increase. Medicinal plants have been used for several purposes including antimicrobial effects and have shown inhibition of fungal growth. *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., Brazilian flora plant, known popularly as pariparoba, or caapeba, has among its constituents, sitosterol, stigmasterol, 4-nerolidylcatechol (4-NC) and sesquiterpenes. This work studied the antifungal effect of extracts and essential oils of *P. umbellata* well as changes in the fungus-related action of plant extract, compared to strains of *Trichophyton rubrum* (Tr1 and Tr FOC), *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. The results demonstrated the good action for the hexane fraction (FHex) of ethanolic extract of *P. umbellata*, with an MIC of 9.76 µg/mL and 31.25 µg/mL for 4-NC against Tr1 strain. The *in vitro* cytotoxicity test showed an IC<sub>50</sub> of 40.05 µg/mL for the hexane fraction and <15.625 µg/mL for 4-NC to the strain of macrophages J774. The determination of fungal ergosterol showed a percentage decrease compared to the fraction FHex for Tr1 and Mc strains, demonstrating a possible mechanism of action on lipids. By polyacrylamide gel electrophoresis in SDS-PAGE was demonstrated differences in the profile protein in Tr1 and Mc strains when treated with FHex in comparison with the control. The analysis of protein profiles by two-dimensional (2D) gel

electrophoresis showed differences in the expression of some proteins, in particular proteinases that might influence fungal infection. Changes were also observed in relation to the development of hyphae and spores.

Key-words: *Pothomorphe umbellata*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, antifungal activity, fungal protein analysis

## Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Esquema do via biossintética do ergosterol. Genes e enzimas envolvidos	27
Figura 2: <i>Pothomorphe umbellata</i>	38
Figura 3: 4 Nerolidilcatecol	39
Figura 4: Alvos celulares dos antifúngicos	42
Figura 5: Estrutura química dos azóis Fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol	43
Figura 6: Estrutura química da Anfotericina B e Nistatina	44
Figura 7: Estrutura química da Caspofungina	45
Figura 8: Estrutura química da terbinafina	45
Figura 9: Estrutura química da 5-Fluorocitosina	46
Figura 10: Fluxograma da preparação de extratos e frações de <i>P. umbellata</i>	56
Figura 11: Esquema da placa para determinação da CIM	66
Figura 12: Representação das concentrações dos extratos vegetais e antifúngicos na placa de microdiluição	73
Figura 13 A e B: CCD das frações do extrato etanólico de <i>P. umbellata</i> . Fase móvel Ac. Etila/Etanol (6:4), revelador anisaldeído sulfúrico (A) e frente a luz UV (B).	77
Figura 14: Cromatograma do fracionamento de FHex, Fase móvel Hex/Aceta Etila 8:2 revelador Anisaldeído	80
Figura 15: CCD das frações de FHex. A, C e E reveladas com anisaldeído sulfúrico, B, D e F frente a luz UV. Fase móvel Hex/Aceta Etila 6:4	81
Figura 16: Frações do fracionamento V, Fase móvel Hexano/Acetato de Etila 7:3, revelador anisaldeído	82
Figura 17: CCD frações de <i>P. umbellata</i>	83
Figura 18: CCD fração F2 e F2C	84
Figura 19: Frações do fracionamento V	84
Figura 20: Cromatografia das frações de <i>P. umbellata</i> I	85
Figura 21: Cromatografia frações de <i>P. umbellata</i> III	86

Figura 22: Cromatograma das frações F01 e F2 de <i>P. umbellata</i>	87
Figura 23: Cromatograma CG-EM do óleo essencial de <i>P. umbellata</i>	88
Figura 24: Cromatograma CG-EM da fração F2 de <i>P. umbellata</i>	90
Figura 25: Cromatograma CG-EM da fração F2C de <i>P. umbellata</i>	92
Figura 26: Espectro APCI modo negativo do 4-Nerodilcatecol	93
Figura 27: Estrutura do 4 NC e padrão de ruptura	93
Figura 28: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do 4-Nerolidilcatecol	94
Figura 29: Estrutura da 4-nerodilcatecol (Substância 1)	95
Figura 30: IC <sub>50</sub> do óleo essencial, extrato EtOH 70, frações e substâncias isoladas de <i>P. umbellata</i> frente a linhagem de macrófagos J774	100
Figura 31: Espectro de ergosterol	101
Figura 32: SDS-PAGE linhagem Mc	103
Figura 33: SDS-PAGE linhagem Tr1 frente a frações de <i>P. umbellata</i>	104
Figura 34: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição controle quando comparada com a tratada com FHex	106
Figura 35: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc controle frente ao voriconazol	107
Figura 36: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc controle frente ao voriconazol	108
Figura 37: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição de tratamento frente a FHex e voriconazol	111
Figura 38: Spots diferencialmente expressos na linhagem Tr1 na condição controle e tratamento frente a FHex	112
Figura 39: Spots diferencialmente expressos na condição controle da linhagem Tr1 com a condição de tratamento com voriconazol	113
Figura 40: Zimografia em gel de gelatina do filtrado fungico da linhagem Tr1. Coluna 1 Tr1 controle, coluna 2 Tr1 frente a FHex	115
Figura 41: Zimografia em gel com gelatina linhagem Tr1. 1- condição controle, 2- condição de tratamento frente a FHex.	116
Figura 42: Germinação de esporos da linhagem Tr1 frente a fração FHex	117
Figura 43: Hifas da linhagem Tr1 (sem tratamento). A e B aumento 20x, C aumento 40x.	117
Figura 44: Hifas da linhagem Tr1, tratamento CIM (9,76 µg/mL). A	118

aumento 20x, B aumento 40x.

Figura 45: Hifas da linhagem Tr1, tratamento 2 x CIM (19,52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A aumento 20x, B aumento 40x. 118

Figura 46: Hifas da linhagem Tr1, tratamento 4 x CIM (39,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A aumento 20x, B aumento 40x. 118

## Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1: Substâncias isoladas de <i>P. umbellata</i> descritas na literatura	39
Tabela 2: Linhagens fúngicas	64
Tabela 3: Concentração da fração hexano e voriconazol utilizada no ensaio de quantificação do ergosterol	68
Tabela 4: Gel de separação a 12%	70
Tabela 5: Gel de empilhamento a 5%	70
Tabela 6: Análise granulométrica	75
Tabela 7: Metabólitos secundários em <i>P. umbellata</i>	76
Tabela 8: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 13	77
Tabela 9: Frações e rendimento do fracionamento do extrato etanólico 70° GL	78
Tabela 10: Frações e rendimento do fracionamento da fração F. Hex	79
Tabela 11: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 14	80
Tabela 12: Frações e rendimento do fracionamento IV	81
Tabela 13: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 16	82
Tabela 14: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 21	86
Tabela 15: Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>P. umbellata</i> .	89
Tabela 16: Substâncias identificadas na fração F2 de <i>P. umbellata</i> .	91
Tabela 17: Substâncias identificadas na fração F2C de <i>P. umbellata</i> .	92
Tabela 18 – Dados de RMN de $^1\text{H}$ da 4-nerolidilcatecol – (Substância 1), ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 500 MHz)	95
Tabela 19: Concentração Inibitória Mínima(CIM) para os extratos e óleo essencial de <i>P. umbellata</i> frente as linhagens fúngicas	96



Tabela 20: Concentração Inibitória Mínima(CIM)para frações do extrato etanólico 70° GL (EtOH 70) de <i>P. umbellata</i> frente as linhagens fúngicas	97
Tabela 21: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para sub frações da fração Hexano (FHex) do extrato etanólico 70° GL (EtOH 70) de <i>P. umbellata</i> frente as linhagens fúngicas	98
Tabela 22: Concentração Inibitória Mínima(CIM)Determinação da CIM para substâncias isoladas da fração Hexano (FHex) do extrato etanólico 70° GL (EtOH 70) de <i>P. umbellata</i> frente a linhagem Tr1	98
Tabela 23: IC <sub>50</sub> do óleo essencial, extratos EtOH 70, frações e substâncias isoladas de <i>P. umbellata</i> frente a linhagem de macrófagos J774	99
Tabela 24: IC <sub>50</sub> do extratos EtOH 70 e fração FHex extraídos de <i>P. umbellata</i> frente a fibroblastos SIRC ATCC CCL60	100
Tabela 25: Dosagem do ergosterol das linhagens Tr1 e Mc.	102
Tabela 26: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição controle comparada a condição FHex.	105
Tabela 27: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição controle comparada a condição voriconazol.	109
Tabela 28: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc frente ao voriconazol e frente a FHex.	110
Tabela 29: Spots diferencialmente expressos na linhagem Tr1 frente ao na condição controle e frente a condição FHex.	113
Tabela 30: Spots diferencialmente expressos na linhagem Tr1 na condição controle e tratamento frente a voriconazol	115
Tabela 31: Avaliação do sinergismo	111

## Lista de Abreviaturas

4-NC: 4 nerolidilcatecol

ATCC: American Type Culture Collection

BAW: Fase móvel para Cromatografia em Camada Delgada, composta por n-Butanol. Ácido acético e Água

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CFM: Concentração fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetilsulfoxido

Ext. Aq.: Extrato aquoso de *P. umbellata*

Ext. Hex: Extrato hexânico de *P. umbellata*

Ext. Hex/Ac: Extrato hexânico/Acetato de etila (1:1) de *P. umbellata*

EtOH 70: Extrato etanólico 70° GL

EtOH 50: Extrato etanólico 50° GL

EUCAST: European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing

FAc: Fração Acetato de etila do extrato etanólico 70° GL (fracionamento III)

FAc. etila: fração acetato de etila do extrato etanólico 70° GL (fracionamento II)

FClor: Fração clorofórmio do extrato etanólico 70° GL

FHex: Fração hexânica do extrato etanólico 70° GL

FHex/Ac: Fração hexano acetato de etila (1:1) do extrato etanólico 70° GL

FInt: Fração intermediária

FRes: Fração residual aquosa do extrato etanólico 70° GL, após partição com hexano

HMG: Grupo de alta mobilidade

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

Mc: *Microsporium canis*, isolado clínico

pI: Ponto Isoelétrico

Subs 1: Isolada da F. Hex

Subs 2: Isolada da F Hex

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio

Tr1: *Trichophyton rubrum*, linhagem isolado clínico

Tr FOC: *Trichophyton rubrum*, linhagem cedida pela Fundação Oswaldo Cruz

Tm: *Trichophyton metagrophytes*, linhagem cedida pela Fundação Oswaldo Cruz

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b>	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	23
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	26
2.1. Fungos	26
2.1.1. Dermatófitos	29
2.1.2. Genero Trichophyton	31
2.1.2.1. <i>Trichophyton rubrum</i>	31
2.1.3. Gênero <i>Microsporum</i>	32
2.1.3.1. <i>Microsporum canis</i>	32
2.1.4. Epidemiologia das Dermatofitoses	32
2.1.5. Proteínas Fúngicas	35
2.2. <i>Pothomorphe umbellata</i>	37
2.3. Antifúngicos	41
2.3.1. Azóis	42
2.3.2. Polienos	44
2.3.3. Equinocandinas	44
2.3.4. Alaminas	45
2.3.5 Fluoropirimidinas	46
<b>3. OBJETIVOS</b>	48
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	49
4.1. Material	49
4.1.1. Equipamentos	49
4.1.2. Vidraria	50
4.1.3. Solventes, reagentes e meios de cultura	50
4.2. Métodos	51
4.2.1. Análises Físico Químicas	51
4.2.1.1 Caracterização da matéria prima vegetal	51
4.2.1.2. Determinação do pH	52
4.2.1.3. Determinação do teor de extrativos	52
4.2.1.4. Granulometria	52

4.2.1.5. Perda por dessecação em balança com infravermelho	53
4.2.2. Triagem fitoquímica	53
4.2.2.1. Pesquisa de saponinas	53
4.2.2.2. Pesquisa de Taninos	53
4.2.2.2.1. Taninos em cloreto férrico em metanol	53
4.2.2.2.2. Taninos em acetato de chumbo	54
4.2.2.3. Pesquisa de Antraquinonas	54
4.2.2.3.1. Pesquisa de Antraquinonas livres	54
4.2.2.3.2. Pesquisa de Glicosídeos Antraquinônicos	54
4.2.2.4. Pesquisa de Flavonóides	54
4.2.2.4.1. Reação de Shinoda	54
4.2.2.4.2. Reação do Cloreto Férrico	55
4.2.2.4.3. Reação do Cloreto de Alumínio	55
4.2.2.4.4. Reação de Pew	55
4.2.2.4.5. Reação de Taubock	55
4.2.3. Preparação dos Extratos Vegetais e Frações	56
4.2.3.1. Preparação do Extrato hidroalcoólico	56
4.2.3.1.1. Partição líquido/líquido do Extrato Etanólico 70° GL com Hexano – Fracionamento I	57
4.2.3.1.2. Partição líquido/líquido do extrato etanólico 70° GL- Fracionamento II	57
4.2.3.1.3. Fracionamento da fração hexano por cromatografia em coluna- Fracionamento III	58
4.2.3.1.4. Partição líquido/líquido do do Extrato Etanólico 70° GL – Fracionamento IV	58
4.2.3.1.5. Fracionamento da fração Intermediária (F. Int) por cromatografia em coluna- Fracionamento V	59
4.2.3.2. Preparação do extrato aquoso	59
4.2.3.2.1. Preparação do extrato aquoso inf	59
4.2.3.3. Preparação do extrato hexânico	59
4.2.3.4. Preparação do extrato hexano/Acetato de etila	59
4.2.3.5. Extração do óleo essencial	60
4.2.3.6. Obtenção da Substância 1	60

4.2.3.7. Obtenção da Substância 2	60
4.2.4. Análise Cromatográfica	61
4.2.4.1. Triagem Cromatográfica em Camada Delgada	61
4.2.4.2. Identificação dos constituintes químicos por GC-EM	61
4.2.4.2.1. Identificação de substâncias presentes nas frações F2 e F2C e Óleo essencial	61
4.2.4.3. Identificação de substâncias por APCI-IT-MS	62
4.2.4.3.1. Preparo das amostras para análises por APCI-IT-MS	63
4.2.4.3.2. Análise por APCI-IT-MS	63
4.2.4.3. Espectrometria de Ressonância Magnética (RMN)	63
4.2.5. Linhagens fúngicas	63
4.2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	64
4.2.6.1. Diluição dos extratos vegetais	64
4.2.6.2. Preparo do inóculo	64
4.2.6.3. Determinação do CIM	65
4.2.7. Determinação da toxicidade	66
4.2.7.1. Determinação da citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ”	66
4.2.7.1.1. Preparo das amostras	66
4.2.7.1.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos	67
4.2.7.2. Determinação da toxicidade <i>in vivo</i>	67
4.2.8. Quantificação do ergosterol	67
4.2.9. Avaliação de alterações em proteínas fúngicas	69
4.2.9.1. Estabelecimento da curva de crescimento	69
4.2.9.2. Obtenção dos extratos protéicos frente aos extrativos vegetais e aos agentes antifúngicos	70
4.2.9.3. Análise do perfil proteico	70
4.2.9.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	70
4.2.9.3.2. Análise Protéica por Eletroforese Bidimensional	71
4.2.9.3.3. Análise Protéica por Zimografia (protease)	71
4.2.10. Teste de inibição da germinação de esporos	72
4.2.11. Sinergismo	72
4.2.12. Análise do desenvolvimento de hifas	73

<b>5. RESULTADOS</b>	75
5.1. Análises Físico Químicas	75
5.1.1 Caracterização da matéria prima vegetal	75
5.1.1.1. Determinação do pH	75
5.1.1.2. Determinação do teor de extrativos	75
5.1.1.3. Granulometria	75
5.1.1.4. Perda por dessecação em balança com infravermelho	75
5.2. Triagem fitoquímica	75
5.3. Obtenção dos extratos vegetais	76
5.3.1 Obtenção do extrato etanólico EtOH 70	76
5.3.1.1. Fracionamento do Extrato Etanólico 70° GL com Hexano – Fracionamento I	76
5.3.1.2. Fracionamento líquido/líquido do extrato etanólico 70° GL- Fracionamento II	78
5.3.1.3. Fracionamento da fração hexano por cromatografia em coluna- Fracionamento III	78
5.3.1.4. Fracionamento do Extrato Etanólico 70° GL – Fracionamento IV	81
5.3.1.5. Fracionamento da fração Intermediária (F. Int) por cromatografia em coluna- Fracionamento V	82
5.3.2. Obtenção do extrato aquoso	87
5.3.3. Obtenção do extrato hexânico	87
5.3.4. Obtenção do extrato hexano/acetato de etila	87
5.6. Obtenção do Óleo essencial	88
5.6.1. Determinação da densidade do óleo essencial	88
5.7. Análise do óleo essencial de <i>P. umbellata</i> por CG-EM	88
5.7.1. Análise do óleo essencial	88
5.7.2. Análise da fração F2	90
5.7.3. Análise da fração F2C	91
5.8. Identificação do 4-Nerolidilcatecol	92
5.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	95
5.10. Determinação da Toxicidade	99
5.10.1. Toxicidade “ <i>in vitro</i> ”	99

5.10.2- Toxicidade “ <i>in vivo</i> ”	101
5.11. Dosagem do Ergosterol	101
5.12. Avaliação das Proteínas Fúngicas	102
5.12.1. Determinação do perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida	102
5.12.2. Análise do perfil proteico através da eletroforese 2D	105
5.12.2.1. Análise do perfil proteico através de eletroforese 2D da linhagem Mc.	105
5.12.2.2. Análise do perfil proteico através de eletroforese 2D da linhagem Tr1	112
5.12.3 Análise do perfil proteico por Zimografia	115
5.13. Germinação de esporos	116
5.14. Alterações no desenvolvimento da hifas	117
<b>5.15. Avaliação do sinergismo</b>	119
<b>6. DISCUSSÃO</b>	120
<b>7. CONCLUSÃO</b>	128
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	129



## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas a incidência de infecções causadas por dermatófitos e outros fungos tem aumentado consideravelmente (JESSUP et al., 2000). O aumento das infecções fúngicas pode ser atribuído ao número em constante crescimento de pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes transplantados, com AIDS, câncer ou sob quimioterapia, idade avançada, diabetes, bem como indivíduos hospitalizados com outras doenças graves e submetidos a procedimentos invasivos (MURRAY et al., 2009; VANDEPUTTE et al., 2012). O crescimento na incidência dessas infecções tem gerado problemas na terapêutica. A disponibilidade de antifúngicos na prática médica é relativamente pequena, algumas vezes ineficiente e a maioria deles apresenta certa toxicidade. Além do crescimento dessas infecções, o problema da resistência microbiana também sofreu um aumento acentuado (GIROIS et al., 2006). Além disto, milhares de doenças causadas por fungos afetam plantas economicamente importantes, levando a prejuízos (TORTORA et al., 2012).

Infecções fúngicas invasivas são associadas com significativa morbidade e mortalidade, apesar do tratamento antifúngico ideal, e um elevado custo financeiro. Diagnósticos melhores, novos estudos epidemiológicos e a disponibilidade de novos antifúngicos revolucionaram o campo da micologia médica nas últimas décadas (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). A pesquisa e o desenvolvimento de antifúngicos é um contínuo desafio. Pois além da parede celular, os fungos são metabolicamente similares às células de mamíferos, possuindo várias vias metabólicas homólogas às dos seres humanos, e portanto, oferecem poucos alvos específicos o que leva a uma maior dificuldade no desenvolvimento de agentes antifúngicos seletivos (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010; GOLAN et al., 2009).

Esta similaridade também leva ao desenvolvimento de efeitos adversos, como hepatotoxicidade com griseofulvina, flucitosina e azóis; toxicidade renal e distúrbios gastrointestinais com anfotericina B; prurido, exantema cefaleia e febre com caspofungina e outras equinocandinas, dificultando a utilização destes fármacos (GOLAN et al., 2009). Ao utilizar uma droga antifúngica, principalmente quando por via sistêmica, deve-se sempre avaliar seus efeitos adversos, devendo ser prescrita apenas quando necessário, deixando de prescrever quando não houver uma indicação válida (LACAZ et al., 2002).

Os vegetais são fontes de substâncias químicas, com riqueza de diferentes moléculas, sendo muitas ainda não estudadas. A flora brasileira possui imensa diversidade, podendo, por conseguinte ser fonte de inúmeras moléculas desconhecidas e que podem ser utilizadas na manutenção da saúde e prevenção de doenças dos seres vivos.

Entre os fármacos recém aprovados incluem-se compostos de plantas, micro-organismos e animais, além de sintéticos e semissintéticos baseados em produtos naturais.(HARVEY,2008)

Entre os 225 novos fármacos aprovados para uso, entre 1981 e 2010, 58 são de origem biológica, 12 são produtos naturais, 2 produtos naturais de origem botânica, 52 derivados de produtos naturais, 62 são totalmente sintéticos, 5 são sintéticos com farmacóforo que foi ou é de produto natural, 16 sintéticos que imitam produto natural, 6 sintéticos mas com farmacóforo que é ou substância que imita produto natural, 12 são vacinas (NEWMAN & CRAGG, 2012)

Segundo Grothaus et al., (2010) dos 164 compostos antitumorais disponíveis para os médicos em junho de 2009 (dependendo do país), 17% são produtos naturais não modificados, 31% são produtos naturais modificados, 26% são compostos sintéticos, 10% são produtos sintéticos que apresentam inibição competitiva de substrato dos produtos naturais, 12% são compostos sintéticos com um farmacóforo de produtos naturais, 4% são compostos sintéticos com um farmacóforo de produtos naturais que apresentam inibição competitiva de substrato dos produtos naturais.

Entre os antifúngicos, entre os anos de 1981 a 2010, de um total de 29 fármacos moléculas, 1 é de fonte biológica, 3 derivados de produtos naturais, 22 totalmente sintéticos e 3 sintéticos com ação que mimetiza substrato natural (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Os esforços recentes no sequenciamento do genoma de dermatófitos, transcriptoma e análise proteômica fornecem formas eficazes para encontrar novas possibilidades para curar e prevenir doenças causadas por fungos (MARTINEZ-ROSSI, 2008).

Estes fatos sugerem a necessidade de estudos voltados para a investigação de novas estratégias terapêuticas bem como do desenvolvimento

de novos produtos direcionados para medidas profiláticas e preventivas como desinfetantes e saneantes. Entre as estratégias pode-se citar a pesquisa de moléculas presentes em plantas.

Plantas medicinais têm sido usadas para vários propósitos incluindo efeitos antimicrobianos e tem apresentado inibição do crescimento de fungos (LEMOS et al., 2005).

Em pesquisa anterior (mestrado) desenvolvida pelo autor, observou-se a ação de extratos de *Pothomorphe umbellata* frente a dermatófitos, porém não foi evidenciado qual a substância ou conjunto de substâncias é responsável por tal ação, bem como nada foi descrito na literatura sobre possíveis mecanismos de ação. A necessidade de continuar os estudos iniciados durante o mestrado, visando aprofundá-los e buscar respostas justificam o trabalho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

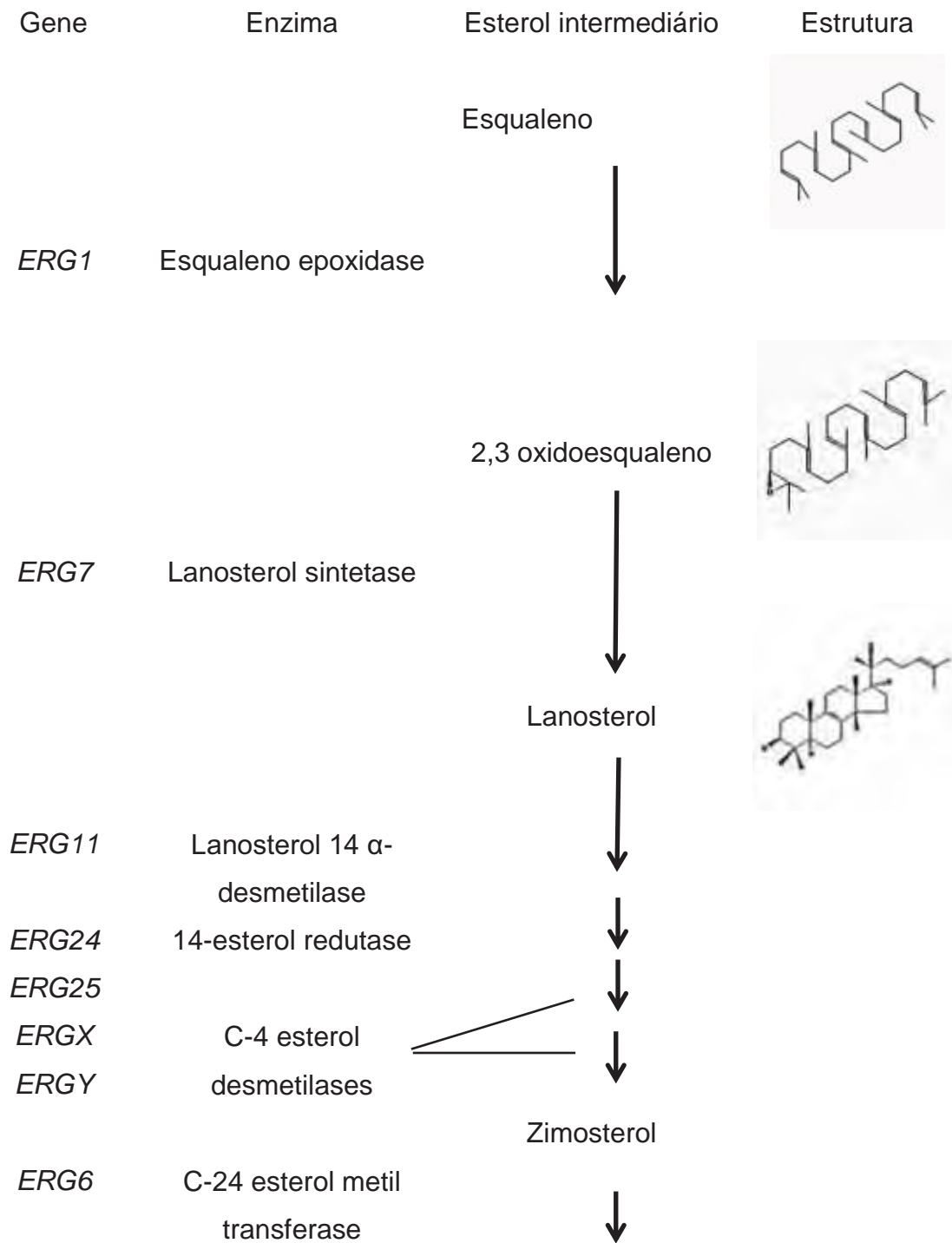
### 2.1. Fungos

Fungos são seres eucariontes, aeróbios, heterotróficos, que se dividem por mitose, apresentam mitocôndria, aparelho de golgi, retículo endoplasmático, são aclorofilados e possuem parede celular. A parede celular é formada por quitina, 1,3- $\beta$ - e 1,6- $\beta$ -glucano e manoproteínas (LACAZ et al., 2002, LENG et al., 2008). Esta parede nas leveduras e fungos filamentosos, quando digerida leva a formação de protoplasto. A membrana plasmática é formada por uma bicamada de fosfolipídios, ergosterol e microtúbulos compostos de tubulina. Morfologicamente os fungos se dividem em dois tipos: unicelulares, representado pelas leveduras e multicelulares representados pelos fungos filamentosos (ALMEIDA, 2008). Reproduzem-se através da formação de esporos, que podem ser sexuados ou assexuados. A forma do fungo que produz esporos sexuados é denominada teleomorfo, e a forma que produz esporos assexuados é denominada anamorfo. Os fungos nas classes de Zigomicetos, Arquiscomicitos, Basidiomicetos, Hemiascomicitos e Euscomicitos produzem tanto esporos sexuados como assexuados (MURRAY et al., 2009). Estão relacionados com decomposição de matéria vegetal morta e associação com plantas auxiliando na absorção de minerais. Os seres humanos os utilizam de várias formas, algumas espécies podem ser utilizadas diretamente como alimento ou ainda na produção de alimentos, na produção de produtos farmacêuticos, enzimas, ácidos orgânicos, bebidas, no controle biológico de insetos, além de apresentarem espécies alucinógenas. Dentre as espécies com importância econômica pode-se citar *Aspergillus niger*, relacionado com produção de ácido cítrico, *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado na produção de pão e vinho, *Trichoderma*, utilizado na produção de celulase (TORTORA et al., 2012; LACAZ et al., 2002).

Todos os fungos apresentam parede celular, ao menos em algum estágio da vida e apresenta quitina, que confere elevada rigidez e resistência à degradação microbiana (ALMEIDA, 2008).

Esteróis são componentes lipídicos importantes das membranas, por estarem presentes na membrana plasmática e também em organelas intracelulares, incluindo peroxissomos, mitocôndrias, vacúolos, lisossomo,

retículo endoplasmático. A presença de esteróis em membranas modula a sua espessura fluidez e permeabilidade. As células fúngicas contêm um esteróide único o ergosterol (ZHANG e RAO, 2010). Na figura 1 esta apresentada a via biossintética do ergosterol.



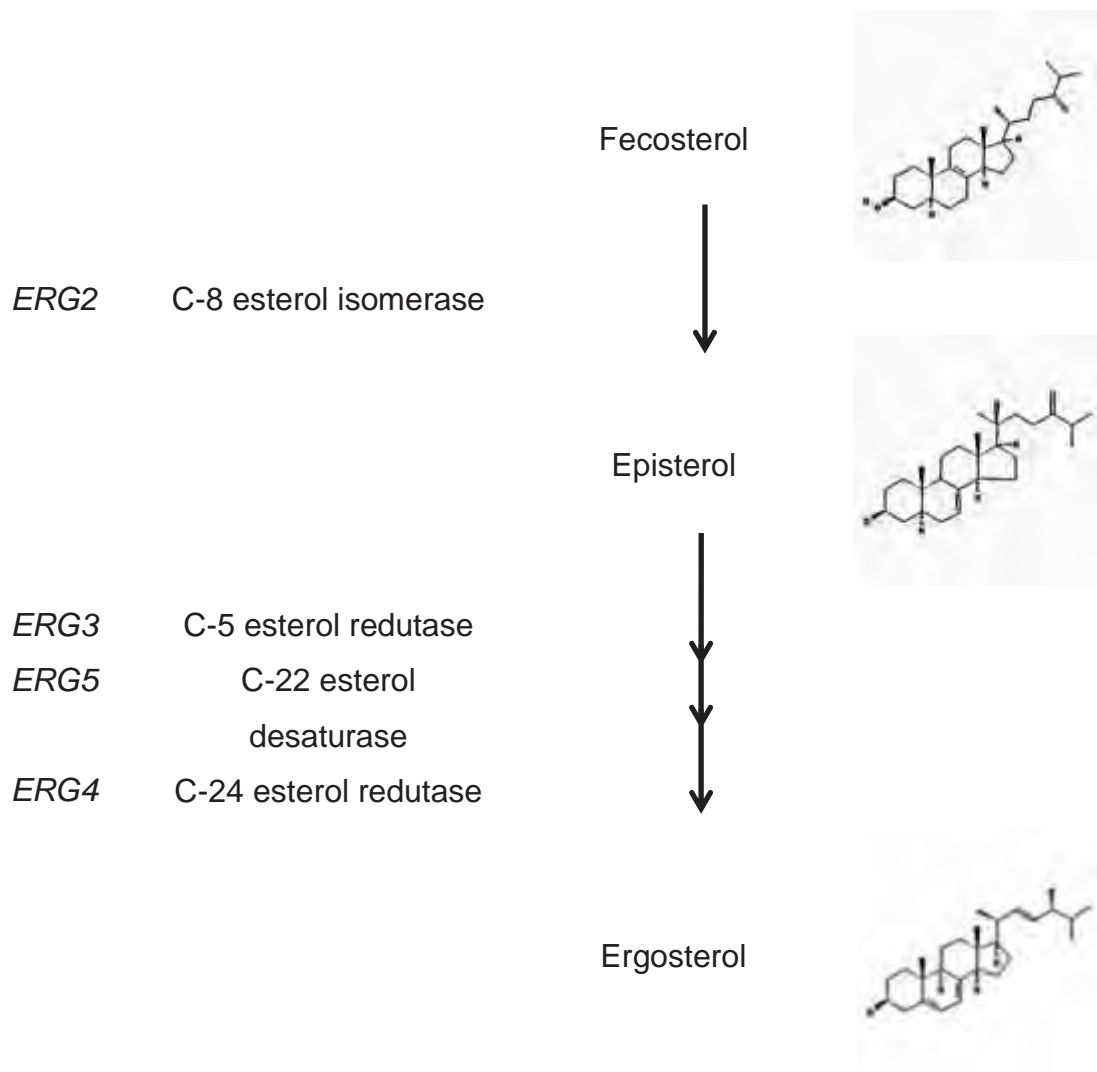


Figura 1: Esquema de via biossintética do ergosterol. Genes e enzimas envolvidos, adaptada de White et al. (1998). (Estruturas fonte: NCBI PubChem Substance).

Ergosterol é o esteroisom primário nas membranas celulares de fungos filamentosos, é um componente de membranas em micélios, esporos e células vegetativas, porém um componente minoritário na maioria das plantas superiores, (CZACZYK, et al., 2002)

Os fungos estão relacionados com doenças em plantas e animais. Os fitopatogênicos podem causar danos e prejuízos a agricultura, os que estão mais adaptados a animais são responsáveis por várias doenças sistêmicas, superficiais ou ainda alérgicas (VANDEPUTTE et al., 2012)

As infecções de origem fúngica são chamadas de micoses, sendo classificadas em sistêmicas, subcutâneas, cutâneas, superficiais e

oportunistas, de acordo com o envolvimento no tecido e modo de entrada no hospedeiro (TORTORA et al., 2012).

Entre os fungos patogênicos podemos citar cândida, paracocidioides, e dermatófitos, que são um grupo especial de fungos que afetam tecidos queratinizados de humanos e outros vertebrados causando infecções superficiais (CARRILO-MUNÓZ et al., 2004).

A taxonomia clássica dos fungos se baseia na morfologia e no modo de produção de esporos onde estes são divididos como leveduras ou fungos filamentosos. As leveduras são usualmente unicelulares e produzem colônias arredondadas, pastosas, ou mucóides no ágar e reproduzem-se por brotamento ou por fissão. Os fungos filamentosos são organismos multicelulares com estruturas tubulares filamentosas chamadas hifas que podem ser cenocíticas (ocas e multinucleadas) ou septadas e que se mantêm unidas para formar o micélio. As colônias dos fungos filamentosos são descritas como algodonosas ou cotonosas (MURRAY et al., 2009). Segundo Tortora et al. (2012), os principais filos de fungos com importância médica são Zigomiceto, Ascomiceto e Basidiomiceto. Dentro dos Ascomicetos encontram-se os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*.

### 2.1.1. Dermatófitos

Dermatófitos são um grupo de fungos queratinofílicos, estreitamente relacionados, capazes de invadir tecidos queratinizados como pele, pelo e unhas, resultando numa infecção comumente conhecida como tinea ou tinha, em humanos e animais (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995). Possuem duas propriedades importantes, são queratinofílicos e queratinolíticos. Isso significa que eles têm a capacidade de digerir queratina *in vitro* em seu estado aprófito e utilizá-la como um substrato, alguns podem invadir os tecidos *in vivo* e provocar tinhas. No entanto, sua morfologia em fase de crescimento parasita é diferente da morfologia exibida em cultura ou *in vitro* (SIMPANYA, 2000)

Eles não são oportunistas, mas fungos patogênicos infectando o estrato córneo, unhas ou cabelo de indivíduos saudáveis. Durante a infecção, os tecidos queratinizados têm que ser digeridos em peptídeos curtos e aminoácidos, a fim de ser assimilados através de transportadores (MONOD, 2008).

Os dermatófitos utilizam substratos queratinosos como as fontes de carbono, nitrogênio e enxofre, sendo distribuídos em três gêneros *Epidermophyton*, *Microsporium* e *Trichophyton*. São classificados como antropofílico, zoofílicos e geofílicos com base em suas associações e habitat. Assim, dermatófitos antropofílicos são associadas com os seres humanos, podendo ser transmitidos diretamente de pessoa a pessoa, raramente infectam outros animais; dermatófitos zoofílicos normalmente infectam animais e são associados com os animais, podendo ocasionalmente infectar os seres humanos; os dermatófitos geofílicos, vivem no solo e são patógenos ocasionais de animais e humanos, são principalmente associados a materiais queratinosos, como pêlos, penas, cascos e chifres, mas como uma parte de seu processo de decomposição. Quando dermatófitos infectam humanos, colonizam a camada queratinizada mais externa da pele, e geralmente não invadem tecido vivo (MARTINEZ-ROSSI, 2008; MURRAY et al., 2009), causando infecções superficiais referidas como dermatofitoses (SUMMERBELL et al., 2007). As infecções causadas pelas espécies antropofílicas tendem a ser não inflamatórias, crônicas e difíceis de curar, já as infecções causadas por espécies geofílicas ou zoofílicas tendem a provocar lesões altamente inflamatórias, com intensa reação do hospedeiro e melhor resposta ao tratamento (MARTINEZ-ROSSI, 2008; MURRAY et al., 2009). Tradicionalmente as micoses são nomeadas de acordo com as localizações anatômicas envolvidas, acrescentando o termo latino que designa o local do corpo após a palavra *tinea*. Por exemplo, *tinea capitis*, para micose do couro cabeludo. Estas infecções incluem: (I) *tinea barbae* (micose da barba e bigode), (II) *tinea capitis* (infecções no couro cabeludo, sobrancelhas e cílios), (III) *tinea corporis* (infecções na pele glabra), (IV) *tinea cruris* (infecções da região da virilha), (V) *tinea pedis* (infecção no pé), (VI) *tinea unguium* ou onicomicose (infecção das unhas), (VII) *tinea manuum* (infecção da mão), (VIII) *tinea favosa* (favo). Vários locais anatômicos podem ser infectados por uma única espécie de dermatófitos, e diferentes espécies podem produzir lesões clinicamente idênticas (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995; MARTINEZ-ROSSI, 2008). No entanto, a doença geralmente conhecida como *tinea ou micose* pode ser uma consequência da reação inflamatória do



hospedeiro às enzimas secretadas pelo fungo durante o processo invasivo (MARTINEZ-ROSSI, 2008).

Dentre os fungos dermatófitos causadores de infecções destaca-se o gênero *Trichophyton*, principalmente a espécie *Trichophyton rubrum*, sendo esta uma das mais adaptadas ao ser humano, causando infecções na pele, pelo e unha. Encontra-se também *Microsporum canis* relacionado a micoses em animais.

### **2.1.2. Gênero *Trichophyton***

Este gênero produz paredes lisas, macroconídios e microconídios. Macroconídios apresentam paredes finas em forma de charuto, são multisseptados, de base larga, pouco numerosos ou ausentes (algumas espécies produzem raramente). Microconídios podem ser piriformes 2-3 µm ou irregulares, simples, numerosos e são lateralmente situados. (SIMPANYA, 2000, LACAZ et al., 2002).

#### **2.1.2.1. *Trichophyton rubrum***

Suas colônias são filamentosas, com aspecto algodinoso, branca, tendo o reverso muitas vezes de cor vermelha. O crescimento das colônias varia de lento a moderado (7 - 14 dias), os microconídios são clavados ou piriformes, com 2-3 x 3-5 µm de tamanho, disposto ao longo das hifas e produzem raros macroconídios. É um dermatófito antropofílico que causa principalmente lesões na pele e unhas. Ao exame direto do material clínico observa-se a presença de hifas septadas hialinas, muitas vezes com artrósporos. (LACAZ et al., 2002).

A reprodução sexual em ascomycetos é regulada, em parte, por dois genes de cruzamento diferentes "mating-type genes", um gene codifica uma proteína com um grupo de domínio de alta mobilidade (HMG), e outro codifica uma proteína com um domínio tipo alfa box (MAT). Fungos homotáticos normalmente possuem ambos os genes e são auto-fertilizados, fungos heterotáticos possuem apenas um gene e exigem um parceiro com um gene de cruzamento complementar. A presença de vários genes relacionados com reprodução sexual, como um gene que codifica uma proteína de um grupo de alta motilidade (HGM) e outros genes relacionados a meiose sugerem que *T. rubrum* possui ciclo sexual (WANG et al., 2006).

*T. rubrum* produz várias enzimas entre as quais, esterases. O fungo pode apresentar um perfil de bandas aumentado em presença de antifúngicos ou stress, sugerindo que estas esterases podem ser uma resposta celular não específica ao stress, ou que participam dos processos de detoxificação na presença do antifúngico (FACHIN et al., 2001).

### **2.1.3. Gênero *Microsporum***

O gênero produz tanto microconídios quanto macroconídios. Os macroconídios são multiseptados, com uma parede fina ou equinulada, fusiformes, podendo ser numerosos ou escassos. No entanto, a característica essencial distintiva deste gênero é a equinulação na parede celular macroconidial. A espessura da parede celular varia dependendo da espécie. Microconídios são piriformes, cerca de 2-3 μm (SIMPANYA, 2000). Os macroconídios são numerosos, com grande número de tabiques, sendo raras as espirais. Apresenta hifas pectinadas, micélio em raquete e clamidoconídios (LACAZ et al., 2002).

#### **2.1.3.1. *Microsporum canis***

As colônias se desenvolvem bem em ágar Sabouraud, formando micélio algodinoso ou aveludado, de cor branca ou amarelada, podendo adquirir tonalidade marrom clara no centro. Superfície da colônia apresenta-se plana ou com ranhuras espaçadas e borda radiadas. O reverso da colônia é amarelo ou marrom-claro. Os macroconídios são numerosos, fusiformes e equinulados, parede fina e rugosa, medindo 8 a 20 μm de largura por 40 a 150 μm de comprimento, possuindo de 6 a 15 células. Os microconídios apresentam-se em pequena quantidade, são unicelulares, clavados ou alongados e encontrados ao longo da hifa. As hifas podem ser observadas em raquete, pectinadas, com corpos nodulares e clamidoconídios (LACAZ et al., 2002; TORTORA et al., 2012).

### **2.1.4. Epidemiologia das Dermatofitoses**

A maioria das micoses são causadas por fungos que residem na natureza, mas parece haver uma considerável variabilidade intracontinental na incidência das infecções fúngicas em todo o mundo. Além disso, diferentes

localizações geográficas favorecem diferentes padrões de infecção. A epidemiologia das infecções fúngicas superficiais mudou significativamente no século passado e reflete as mudanças nas condições sócio-econômicas, estilo de vida e migração (HAVLICKOVA et al., 2008; AMEEN, 2010).

*Trichophyton rubrum* é o principal agente causador da *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea ungueal*, *tinea cruris* e provavelmente se manterá na posição (AMEEN, 2010). *T. rubrum*, *T. interdigitale* (*mentagrophytes* var. *interdigitale*), *M. canis*, *M. audouinii*, *T. tonsurans* e *T. verrucosum* representam a maioria das dermatofitoses globalmente, mas as taxas de incidência de micoses específicas podem variar muito. A maior incidência de *T. rubrum* foi relatada na Europa, enquanto *T. mentagrophytes* foi mais comumente relatada na Ásia. (HAVLICKOVA et al., 2008). Embora nos países desenvolvidos, a incidência de *tinea capitis* esteja em declínio, *tinea pedis* e *onicomicose* estão se tornando um problema econômico e epidemiológico. A substituição de outros dermatófitos por *T. rubrum* é provavelmente relacionada a inúmeras possibilidades de infecção por este fungo, devido à sua enorme distribuição na população (SEEBACHER et al., 2008).

Cada vez mais, *tinea pedis* causada por *T. rubrum* e *T. interdigitale* (*mentagrophytes* var. *interdigitale*) parece ser uma infecção característica de países altamente desenvolvidos, com a expansão do esporte e instalações de fitness, a prevalência crescente de obesidade e diabetes mellitus e o envelhecimento da população. *Microsporum canis* é um agente de *tinea capitis* prevalente no mundo desenvolvido e isso poderia estar relacionado ao turismo de massa para regiões endêmicas (como a área do Mediterrâneo) e da estreita associação entre seres humanos e animais domésticos (HAVLICKOVA et al., 2008).

Várias espécies de dermatófitos são geograficamente limitadas. *Trichophyton violaceum* é endêmico em certas partes da Europa Oriental, África, Ásia e América do Sul, mas não na América do Norte. *Trichophyton soudanense* é uma causa comum de *tinea capitis* no noroeste da África tropical e Oeste da Ásia sendo endêmico nestas regiões. O aparecimento esporádico de ambos na Europa Ocidental e nos EUA fornece evidência da constante evolução da epidemiologia das dermatofitoses em

relação viagens internacionais, imigração e mudanças na demografia da população (HAVLICKOVA et al., 2008).

Com a terapia antifúngica eficaz e melhoria das condições socioeconômicas, os agentes antropofílicos de tinea capitis, *M. audouinii* e *T. schoenleinii*, foram erradicados da maioria dos países desenvolvidos. No entanto, foram substituídos pela atual epidemia de *T. tonsurans* (tinea capitis) que se apresenta como um desafio ao controle destas dermatofitoses. O conhecimento das tendências epidemiológicas das dermatofitoses e a compreensão de suas causas pode levar à implementação de medidas de saúde pública para interromper o aumento destas infecções (AMEEN, 2010).

Uma característica epidemiológica incomum é mostrado por *Epidermophyton floccosum*. Este fungo foi a causa mais frequente de dermatomicoses na Alemanha em 1920/1930. Em 1950, sua frequência foi de cerca de 5-6% e em 1990 apenas 1%. Na Polónia, Itália e Grécia, entre 1980/1990 *E. floccosum* foi consideravelmente maior com cerca de 10% e é o que apresenta maior frequência no Irã, representando 31,4% de todos os isolados de dermatófitos. Ocorrências similares também foram relatadas em outros países islâmicos (SEEBACHER et al., 2008).

Drakensjö & Chryssanthou (2011) realizaram um estudo na Suécia durante 5 anos, onde foram encontradas 8862 amostras positivas para dermatófitos. O patógeno predominante isolado com prevalência de 83% foi o *T. rubrum*, sendo o agente mais encontrado em tinea unguini, tinea pedis, tinea corporis, tinea manuum e tinea cruris. *T. mentagrophytes* foi a segunda espécie mais frequentemente isolada (7,4%). *T. violaceum* foi o principal agente na tinea capitis (63,8%) e tinea faciei (33,3%). *T. rubrum* mostrou uma frequência constante ao longo do período de estudo, enquanto outras espécies, como *T. violaceum*, *T. soudanense* e *M. audouinii* demonstraram aumento na frequência.

Aquino et al. (2007), analisando exames micológicos de pacientes ambulatoriais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, verificaram que de um total de 4954 pacientes, dos quais foram coletadas 5.077 amostras, 2033 foram positivos para dermatófitos, com uma prevalência de 62,4%, para *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes* (18,2%), *Microsporum*

*canis* (5,7%), *Epidermophyton floccosum* (2,0%), *M. gypseum* (1,4%) e *T. tonsurans* (0,3%).

Em estudo realizado com 536 crianças de instituições públicas de Barretos – SP, 48 (9%) foram positivas, com 51 espécimes clínicos coletados, onde *T. rubrum* foi a espécie mais frequente com 34 casos, *T. mentagrophytes* 9 casos, *M. canis* em 6 casos e *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*, apresentaram 1 caso cada, demonstrando uma maior incidência por *T. rubrum* (REZENDE et al., 2008).

Em um laboratório de hospital particular em Chapecó SC, foram coletadas e analisadas 111 amostras clínicas, onde 66 (59,45%) apresentaram-se positivas para dermatófitos. *T. mentagrophytes* foi o mais frequente com 52%, seguido por *T. rubrum* com 17%, *Trichophyton* sp com 12% e *T. tonsurans* com 3%, *E. floccosum*, *M. canis* e *M. gypseum* 2% cada e outras espécies não identificadas 10%. Este estudo demonstrou uma maior prevalência para *T. mentagrophytes* em relação a *T. rubrum* o que pode estar relacionado a características regionais (SCHOELER et al., 2010).

Analisando os dados de 451 animais (cães e gatos) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso, que apresentavam dermatopatia, foram diagnosticados 279 casos de dermatofitoses, correspondendo a 61,9% do total, onde *M. canis* foi o principal agente identificado, com 270 casos (96,78%) enquanto *Trichophyton* spp. foi identificado em 3 casos (1,1%) e 6 casos (2,1%) não foi possível estabelecer diagnóstico definitivo (NEVES et al., 2011). Em outro estudo realizado no Hospital Veterinário da UNESP Botucatu, com 136 animais (cães e gatos) 128 (94,1%) apresentaram cultura positiva para *Microsporum* spp, e 8 (5,9%) para *Trichophyton* spp, entre os do gênero *Microsporum* 102 foram identificados como *M. canis*, 3 *M. manum* e 23 não foram identificados, entre os *Trichophyton* 1 foi identificado como *T. mentagrophytes* e 7 não foram identificados, demonstrando que *M. canis* é o principal agente causador de dermatomicoses em animais (PALUMBO et al. 2010).

#### 2.1.5. Proteínas Fúngicas

As proteases incluem todas as enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas (CO-NH) de proteínas e digestão destas em peptídeos ou

aminoácidos livres. Podem ser divididas em endoproteases (ou endopeptidases) e exoproteases (ou exopeptidases). As endoproteases quebram as ligações peptídicas internas, as exoproteases quebram as ligações peptídicas apenas no N- ou no C-terminal das cadeias polipeptídicas (MONOD, 2008).

Asahi et al. (1985) purificaram e caracterizaram duas proteases extracelulares de *T. rubrum*, sendo uma de 44kDa com pI 7,8 e outra de 36kDa com pI 6,5, provavelmente com atividade de serino proteinases e função de degradar a queratina da pele como fonte de nutrientes para o fungo.

Uma metaloprotease queratinolítica de 43,5 kDa e pI 7,7 foi purificada de *M. canis*, a partir do meio de cultura contendo queratina felina, porém em meio contendo peptona e sem queratina esta proteína não foi encontrada (BROUTA et al., 2001).

Apodaca & McKerrow (1989), purificaram e caracterizaram uma proteinase extracelular de *T. rubrum*, com 27 kDa, que apresentou capacidade de degradar azocool, elastina, queratina, laminina, fibronectina, colágeno tipo III e procolágeno tipo IV. Os resultados sugerem que esta proteinase apresenta importante função na captação de nutrientes para o fungo.

SANYAL et al., (1985), extraíram uma proteinase extracelular de caráter alcalino e peso molecular de 34,7 kDa, produzida por *T. rubrum* em meio líquido contendo glicose e peptona, usando um filtrado de cultura do dermatófito; a enzima foi localizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida e isolada através de cromatografia em coluna.

TSUBOI et al., (1989a), fizeram isolamento de proteínas queratolíticas em pH ácido, com peso molecular de 41 kDa. Foi determinado o ponto isoelétrico em 3,9 com pH ótimo de 4,5 e utilizando como substrato quimiotripsina, mostraram que as enzimas dos dermatófitos têm atividade tanto em pH alcalino como em pH ácido, levando a sugerir que seus constituintes estruturais hidrolíticos são importantes fatores de virulência dos dermatófitos (TSUBOI et al., 1989b)

Mignon et al., (1998), purificou e caracterizou uma serino protease de 31,5 kDa e pI 11,8, sugerindo que esta seja secretada por hifas invasoras do tecido, estando relacionada com a invasão e colonização de estruturas queratinizadas.



Amino-peptidases e carboxipeptidases poderiam ser usadas para a degradação de grandes peptídeos gerados por digestão de tecidos queratinizados por endopeptidases. Deve ser salientado que aminoácidos e peptídeos curtos, dependendo da garga, podem ser assimilados por fungos utilizando transportadores de membrana. Portanto, amino-peptidases e carboxipeptidases podem ser importantes para a assimilação de substratos nitrogenados durante a infecção e contribuir para a virulência de dermatófitos (ZAUGG et al., 2008).

Behzadi et al (2008) identificaram um gene que codifica uma proteína de choque térmico (heat shock) de 30 kDa, que pode estar relacionada com a patogênese da infecção causada pelo fungo e resposta a stress.

Através do método de “shotgun” relacionado com pré-fracionamento e digestão por enzimas, foram identificadas 1026 proteínas no conídio dormente de *T. rubrum*, sendo identificadas também proteínas específicas de esporos que podem estar relacionadas com sobrevivência e dispersão de conídios, além de outras ligadas a germinação de esporos e resposta a condições ambientais. O estudo destas proteínas pode auxiliar na compreensão de mecanismos de germinação e manutenção de dormência em conídios (LENG et al., 2008).

A presença da subunidade catalítica da 1,3- $\beta$ -glucano sintase, da quitina sintase e manosiltransferase em conídios sugere que a síntese e reorganização da parede celular pode ser consideravelmente ativada durante a esporulação em *T. rubrum*, e que a parede celular dos seus conídios, semelhante à de outros fungos filamentosos, é composta de 1,3- $\beta$ -glucano, quitina e manoproteína (LENG et al., 2008).

## **2.2. *Pothomorphe umbellata***

Dentre as plantas com possível ação antifúngica observamos a potencialidade em *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., conhecida pelo nome popular de pariparoba ou caapeba, que tem sido usada na medicina popular como analgésico, diurético e agente antiespasmódico, para desordens inflamatórias, malária, asma e doenças gastrintestinais (LORENZI e MATOS, 2002)

*P. umbellata*(figura 2) é utilizada pela população para tratamento de doenças do trato urinário, leucorréia, emenagogo, doenças do trato digestivo, fígado,pele,abscessos, trato respiratório, febre (sudorífico e febrífugo),analgésico (dor), anti-inflamatório, cicatrizantes, edema e reumatismo, em países da África, América do sul e Ásia (ROERSCH, 2010).

Estudo da atividade biológica de *P. umbellata* indicou que os extratos hexânicos e metanólicos possuem substâncias responsáveis pelas atividades antiPAF, anti-inflamatória e analgésica, enquanto que o extrato aquoso mostrou atividade antiedematogênica, anti-inflamatória e analgésica (JANUÁRIO V.A., 1994).A ação analgésica e anti-inflamatória também foi demonstrada por Perazzo et al.(2005). Isobe et al. (2002) demonstraram ação antimicrobiana do alcalóide N-benzoilmescalinacontra *H. pylori*.Extratos da planta demonstraram ação antifúngica, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 78,13 µg/mL nas partições hexano e diclorometano do extrato etanólico (RODRIGUES, 2007).



Figura 2: *P. umbellata*. Fonte: Rodrigues, E.R. (2007)

Na literatura encontramos autores que relataram estudos fitoquímicos sobre *P. umbellata*, conforme demonstrado na tabela 1. Entre os constituintes encontra-se o 4-Nerolidilcatecol (figura 3).



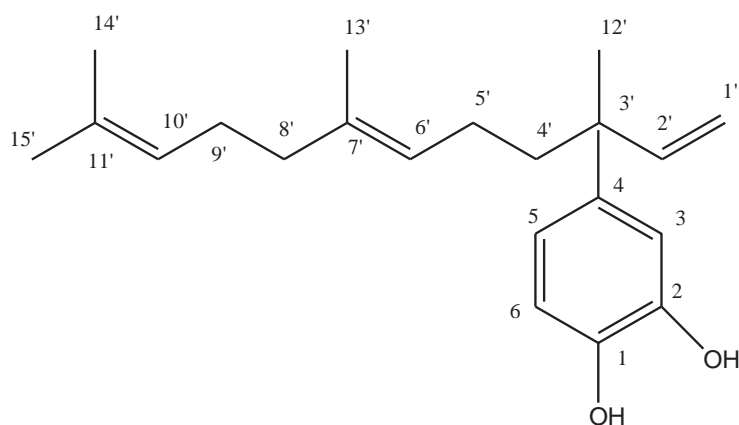


Figura 3: 4-nerolidilcatecol

Tabela 1: Substâncias isoladas de *P. umbellata* descritas na literatura

Extrato	Substância(s)	Parte da planta	Autor
Hexânico e diclorometânico	Sitosterol, estigmasterol, peltatol A	Todas	Januário (1994)
	4-nerolidilcatecol	Folhas e caule	Januário (1994)
Etanólico	Cloreto de potássio, glicose, manose, galactose e alcalóides		Januário (1994)
Óleo essencial	$\delta$ -elemeno, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, $\alpha$ -guaieno, <i>trans</i> -cariofileno, tetrametiltriciclo undec-1-eno, $\alpha$ -humuleno, epibicicloesquifenantreno, $\alpha$ -selineno, $\gamma$ -cadineno, $\beta$ -patchuleno, $\alpha$ -gurjuneno, $\delta$ -cadieno, $\gamma$ -gurjuneno, $\alpha$ -ylangeno, cadineno e nerolidol	Partes aéreas	Januário (1994)
Fração diclorometanólica	oxiranemetanol, hinoquinina, campesterol, estigmaterol, $\beta$ -sitosterol e 4-nerolidilcatecol	Folhas	Perazzo (2006)

Óleo essencial	<i>E</i> -cariofileno, $\delta$ -cadieno, <i>E</i> -nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, elemol, $\beta$ -pineno	Folhas	Mesquita et al. (2005),
Extrato etanólico	arboreumina e arboreumina glicosilada, vitexina 2''-O- $\beta$ -glucopiranosídeo, apigenina 8-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, orientina 8-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, velutina, sesamina, diidrocubebina, ácido <i>p</i> -cumárico , 4-Nerolidilcatecol (4-NC)	Folhas	Bergamo (2003)
Óleo essencial	$\delta$ -elemeno, $\rho$ -cariofileno, germacreno, epizonareno e $\delta$ -cadineno	Folhas	Bergamo (2003)

A biossíntese da unidade terpênica do 4-NC envolve tanto a rota do ácido mevalônico quanto a triose/piruvato (BERGAMO 2003). Sponchiado-Junior (2006) demonstrou a ação da fração acetato de etila de *P. umbellata* sobre *Enterococcus faecalis*. Taboata et al., (2008) isolaram alcalóides de *P. umbellata* (piperumbelactanas A, B e C, N-p-coumaroil tiramina, piperumbelactana D, N- hidroxiaristolam e 4-Nerolidilcatecol ) e analisaram suas ações. As piperumbelactanas A, B e C demonstraram moderada atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase; as piperumbelactanas B e C e o N-p-coumaroil tiramina apresentaram atividade antioxidante; a piperumbelactana D, o N- hidroxiaristolam e o 4-Nerolidilcatecol demonstraram atividade antifúngica. O extrato da raiz de *P. Umbellata*, nas doses de 200, 100 e 50 mg/Kg/dia e o 4-NC, nas doses de 50, 25 e 12,5 mg/Kg/dia, apresentaram efeito protetor contra a genotoxicidade causada pela ciclofosfamida em camundongos, através do teste de eritrócitos

micronucleados, podendo estes resultados estarem relacionados a ação antioxidante do 4-NC (VALADARES et al., 2007). O 4-NC isolado de *Pothomorphe peltata*, apresentou atividade citotóxica frente as seguintes linhagens de células tumorais:CEM (leucemia humana), HL-60 (leucemia humana), MCF-7(tumor de mama humana),B16(melanoma/tumor de pele murina) e HCT-8 (tumor de cólon humano), demonstrando potencial atividade antitumoral (PINTO et al., 2006).

### 2.3. Antifúngicos

Várias são as classes de antifúngicos utilizados na terapêutica: azóis, polienos, equinocandinas. Na lista do Formulário Terapêutico Nacional 2010/Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) constam para uso sistêmico, anfotericina B, fluconazol, itraconazol e para uso tópico cetoconazol, nistatina e miconazol.

Há uma necessidade crescente de antifúngicos devido ao crescimento das populações suscetíveis às limitações do espectro de atividade e tolerabilidade dos antifúngicos atuais e desenvolvimento de resistência aos antifúngicos. Poucos produtos terapêuticos estão atualmente em desenvolvimento ativo, a progressão de agentes terapêuticos com mecanismos de ação fungo específico é da mais alta prioridade (OSTROSKY-ZEICHNER et al, 2010).

Os mecanismos de ação dos antifúngicos podem estar relacionados com esteróis fúngicos (síntese de ergosterol e interação com esteróis de membrana), inibição dos ácidos nucleicos, parede celular e síntese de beta glucana (Figura 4).

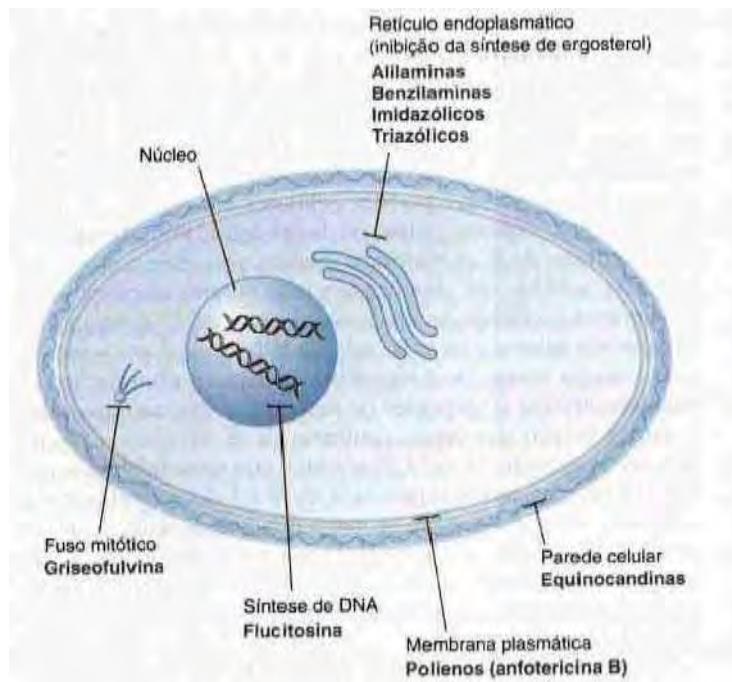


Figura 4: Alvos celulares dos antifúngicos, segundo Golan et al., (2010)

### 2.3.1. Azóis

Oimidazole triazóis são as classes de antifúngicos que temsidobem sucedidos quanto a variedade de agentesque entraram em uso clínico.Osagentesque são licenciadospara uso clínico na doençafúngica invasiva são: fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol (figura 5).Entretanto,amaioria dos antifúngicos imidazólicos são formulados somente para uso tópico, geralmente devido à toxicidade ou biodisponibilidade, problemas que limitam o seu potencial como agentes sistêmicos (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010).

Os azóis agem inibindo a síntese de ergosterol, devido sua ação sobre a enzima lanosterol 14  $\alpha$ -demetilase (ZHANG e RAO, 2010; ALVAREZ et al., 2007).

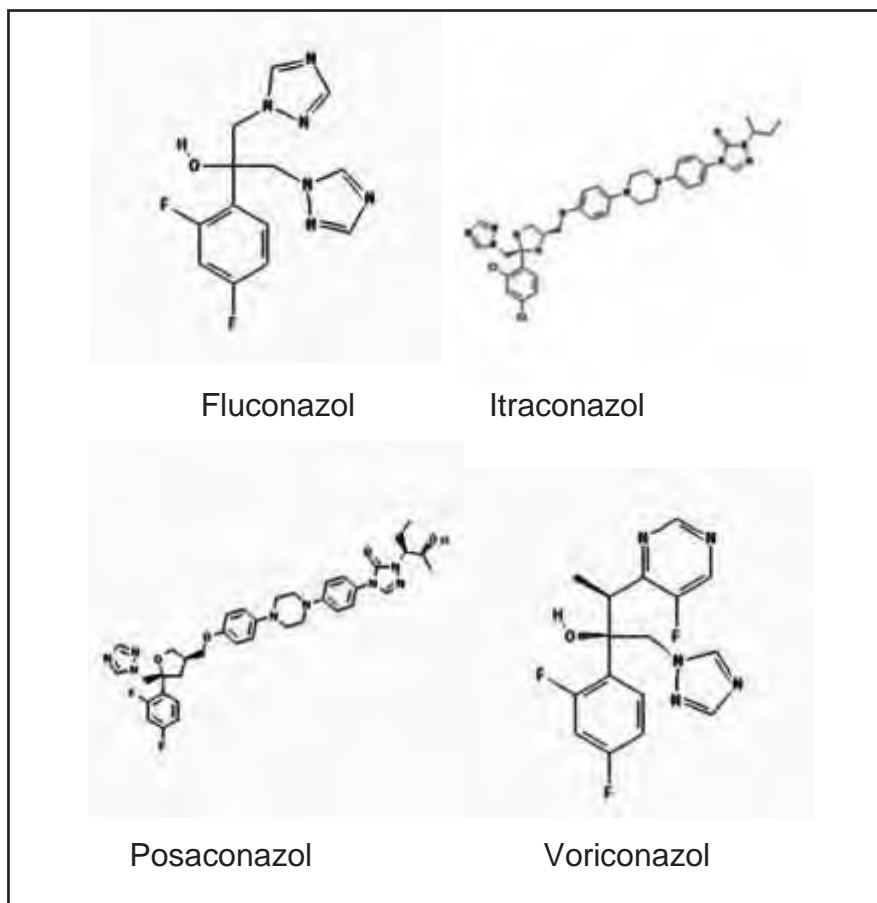


Figura 5: Estrutura química dos azóis Fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol (fonte: NCBI PubChem Substance)

Muitos trabalhos de pesquisa primária e patentes tem divulgado novas moléculas de antifúngicos triazólicos. Porém ainda não é possível saber se algum destes novos triazóis irá mostrar melhorias reais diante dos existentes. Estes poderiam oferecer vantagens, alargando o espectro de atividade para incluir micoses invasivas de difícil tratamento (infecções causadas por *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. ou *Zygomycota*). Além disso, novos triazóis poderiam apresentar um perfil farmacocinético visando reduzir substancialmente a frequência de administração e ou diminuir efeitos adversos. No entanto, nenhum dos triazóis em preparação ainda tem mostrado claramente tais vantagens, principalmente por causa da escassez de dados clínicos (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010).

### 2.3.2. Polienos

A anfotericina B e a nistatina (figura 6) são exemplos de fármacos polienos. A anfotericina é um antifúngico de largo espectro de ação. O mecanismo de ação da anfotericina B está relacionado com sua interação a esteróis da membrana celular, alterando a permeabilidade da célula devido a formação de poros na membrana celular o que leva ao extravasamento de íons e macromoléculas intracelulares (SILVA, 2006, CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). A toxicidade está relacionada a dificuldade do fármaco em diferenciar o ergosterol da célula fúngica do colesterol da célula de mamíferos (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). A nefrotoxicidade é um dos efeitos adversos. Formulações de anfotericina B lipossomal reduziu consideravelmente a incidência de toxicidade renal da anfotericina B. Dois produtos lipídicos - uma formulação lipossomal e um complexo de lipídios - são agora comumente usados para tratar uma ampla gama de micoses de difícil tratamento (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010).

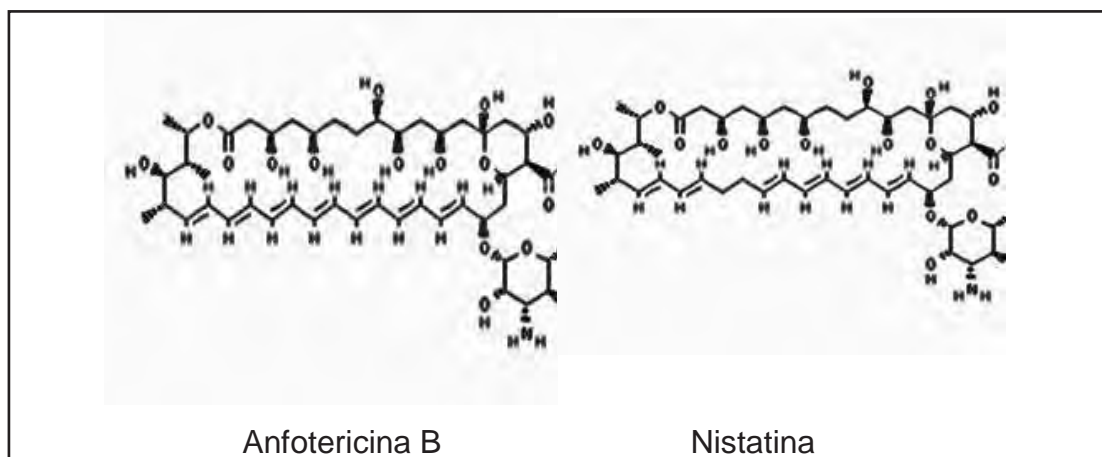


Figura 6: Estrutura química da Anfotericina B e Nistatina (fonte: NCBI PubChem Substance).

### 2.3.3. Equinocandinas

Na classe das equinocandinas, o mecanismo de ação ocorre na parede celular fúngica, com a inibição da síntese de  $\beta$ -(1,3)-glicano, o que leva a desarranjo da parede celular, lise e morte do fungo (SILVA, 2006; DENNING, 2002). Entre os antifúngicos desta classe estão a caspofungina (figura 7), micafungina e anidulafungina, que são aprovadas para uso nos Estados Unidos da América (VANDEPUTTE et al., 2012).

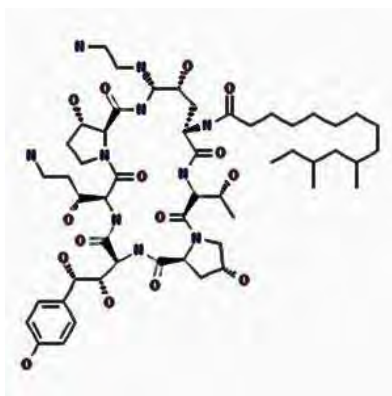


Figura 7: Estrutura química da Caspofungina (fonte: NCBI PubChem Substance).

Seus pontos fortes incluem baixa toxicidade, cinética favorável, permitindo dosagem de uma vez por dia. Porém devido ao alto peso molecular é pouco absorvida por via oral, sendo utilizada por via intravenosa. Apresenta atividade fungicida rápida contra a maioria dos isolados de *Candida* spp., o espectro de ação inclui *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis carinii*, mas não *Cryptococcus neoformans* (DENNING, 2002).

#### 2.3.4. Alilaminas

A terbinafina (figura 8) é um fármaco representante das alilaminas, tem ação primariamente fungicida com mecanismo de ação relacionado à inibição da escalo epoxidase (RYDER, 1992), enzima relacionada a síntese do precursor de ergosterol. A elevada potência da terbinafina, parece estar relacionada a combinação de três fatores, elevada sensibilidade à escalo epoxidase, acumulação do fármaco e inerente sensibilidade do crescimento filamentosos a este mecanismo de ação (FRAVE & RYDER, 1996).

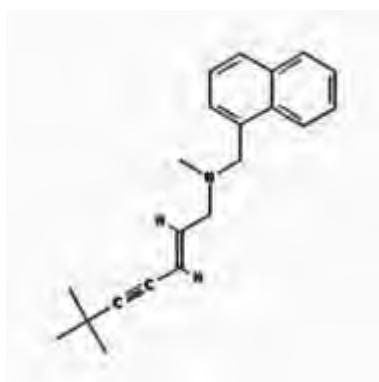


Figura 8: Estrutura química da terbinafina (fonte: NCBI PubChem Substance).

### 2.3.5. Fluoropirimidinas

O mecanismo de ação das fluoropirimidinas, esta baseado na interferência no metabolismo de pirimidinas, DNA e RNA e síntese de proteínas (CARRILO et al., 2006). Entre os fármacos cita-se a 5- fluorocitosina (5-FC), com estrutura apresentada na figura 9, que é captada por citosina permease presente na membrana da célula fúngica e convertida a 5-fluoruracila (5-FU) pela citosina desaminase e depois a 5-fluorodesoxiuridílico (5-FdUMP) que inibe a timidilato sintase resultando na inibição da síntese de DNA e divisão celular (GOLAN et al., 2009). As células de mamíferos não possui a citosina permease o que pode estar relacionado com a menor toxicidade do fármaco, e consequentemente efeitos colaterais menores, como náuseas, vômitos e diarreia, porém ocorre também efeitos mais graves como hepatotoxicidade e depressão da medula óssea, esta toxicidade pode estar relacionada com a conversão da 5-FC por fungos e bactérias intestinais, que pode resultar em um metabólito tóxico a 5-FU (VERMES et al., 2000)

Fungos filamentosos como dermatófitos e *Aspergillus* não são susceptíveis a 5-FC (VANDEPUTTE et al., 2012).

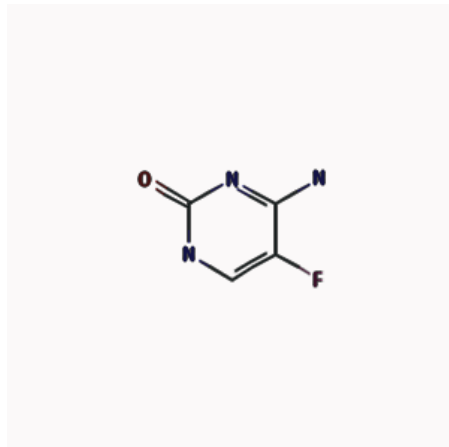


Figura 9: Estrutura química da 5-Fluorocitosina (fonte: NCBI PubChem Substance)

Embora muitas drogas antifúngicas foram desenvolvidas durante as últimas duas décadas, elas se restringem a poucas classes químicas. Além disso, a ocorrência de resistência em isolados clínicos leva ao fracasso no tratamento de micoses. Assim, o controle efetivo de dermatófitos envolverá necessariamente o desenvolvimento de uma nova geração de antifúngicos potentes, de amplo espectro com ação seletiva contra novos



alvos nas células fúngicas e com menos efeitos adversos. No entanto, como a resistência em isolados clínicos pode ocorrer, pode ser um processo que envolve mais de um mecanismo, o entendimento sobre os mecanismos que conferem resistência antifúngica é essencial para projetar modificações em antifúngicos atualmente utilizados (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008). Entre os mecanismos fúngicos utilizados para neutralizar a ação dos antifúngicos, observa-se: a) redução da acumulação de drogas no interior da célula (efluxo de drogas) através de transportadores ABC, transportadores MFS, b) diminuição da afinidade do fármaco pelo alvo, com mutações no alvo levando a diminuição da afinidade ou inibição da ligação, desregulação da expressão do alvo c) modificações no metabolismo fúngico (VANDEPUTTE et al., 2012).

### 3.OBJETIVOS:

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a ação antifúngica, dos extratos e óleos essenciais de *P. umbellata* contra alguns dermatófitos, tentando evidenciar a substância ou grupo de substâncias que possam estar relacionadas com tal atividade, assim como procurar entender as respostas fúngicas frente a tais substâncias, através da análise de proteínas geradas pela exposição das células fúngicas aos extratos e frações. As avaliações das respostas podem orientar e direcionar sobre possíveis mecanismos de ação.

Para tanto realizou-se :

- Avaliação farmacognóstica preliminar da espécie *P. umbellata*
- Obtenção de extratos vegetais, frações e óleo essencial
- Avaliação fitoquímica de *P. umbellata*
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos vegetais, frações e óleo essencial
- Caracterização da atividade antifúngica, pela análise do perfil protéico dos fungos através de SDS-PAGE em presença ou ausência dos extratos com maior atividade.
- Análise proteômica dos extratos extracelulares dos fungos por eletroforese bidimensional

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Equipamentos

Aparelho para focalização modelo IPGphor 3, (GE Healthcare)

Autoclave vertical (FABBE)

Bico de Bunsen

Câmera fotográfica digital (Canon Power Shot A 530)

Capela com fluxo laminar (Veco)

Cromatógrafo a gás Shimadzu modelo QP2010Plus equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar

Cuba para eletroforese (Scie Plas TV400Y)

Mini cuba para eletroforese

Espectrofotômetro mod UV 1603 (SHIMADZU)

Espectrômetro de massas LCQ Fleet(Thermo Scientific)

Espectrômetro Varian Inova 500

Fita para focalização isoeletrica Immobiline DryStrip pH 3-10 NL (GE Healthcare)

Fonte de eletroforese (GRS 3000 STD)

Incubadora com agitação modelo T 422(TECNAL)

Micropipetas com volume ajustável de 1 a 10 µl, 5 a 50 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl (HTL)

Peagômetro(PHTEC modelo 3B)

Placas para cromatografiacom sílica gel 60 fluorescência 254 nm,20x20 cm em alumínio(Merck)

Placa de cromatografia com sílica gel 60 fluorescência 254nm, 10x20 em vidro (Merck)

Placa de microdiluição (TPP)

Programa 2D Platinum (GE Healthcare)

#### 4.1.2. Vidraria:

Placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas, balão de vidro, balão volumétrico, provetas, copo de Becker, bastão de vidro, frascos de Erlenmayer, cuba para revelação da eletroforese, placa de vidro para cromatografia, Cuba de vidro para cromatografia, coluna cromatográfica

#### 4.1.3. Solventes, reagentes e meios de cultura

Acetato de etila(Qhemis)

Ácido acético (Qhemis)

Ácido cítrico (Synth)

Ácido sulfúrico(Qhemis)

Acido tricloroacético (JT Baker)

Acrilamida(Sigma)

Agarose (Life technologies)

Água bidestilada

Água deionizada

Água ultrapura

Álcool etílico(Qhemis)

Álcool metílico (Qhemis)

Álcool metílico grau HPLC (Mallinkrodt)

Anfotericina B (Sigma)

Anisaldeído

Azul de bromo fenol (Synth)

Bis-acrilamida - N.N – metileno bis-acrilamida (Fluka)

Butanol(Qhemis)

Carbonato de sódio(Vetec)

Clorofórmio (Qhemis)

Clorofórmio grau HPLC (Mallinkrodt)

Dicromato de potássio (Merck)

Ditiotreitol – DTT (Invitrogen)

Dodecil Sulfato de Sódio – SDS (JT Backer)

Formaldeído (Qhemis)

Glicina (Dinamica)

Glicerol (Vetec)

Glicose – Dextrose (Synth)  
Hexano (Qhemis)  
Hexano grau HPLC (Mallinkrodt)  
Hidróxido de potássio (Merck)  
Marcadores de Peso Molecular para eletroforese (Invitrogen)  
Meio ágar batata (Himedia)  
Meio Agar Sabouraud (Himedia)  
Meio Caldo Sabouraud (Himedia)  
Meio RPMI 1640 com glicose (Sigma)  
Nitrato de Prata (Avi Cena)  
Peptona (Biobrás)  
Persulfato de Amônio – APS (Mallinchrodt)  
Reagente de Bradford (Sigma)  
Resazurina (Vetec)  
MOPS - ácido 3-(Nmorfolino) propanosulfônico (Acros Organics)  
Tris base - alfa, alfa, alfa-Tris (hidroximetil) Metilamina, Tris (hidroxidi metil amino metano (JT Baker)  
Tris HCl (Sigma)  
Temed (JT Baker)  
Voriconazol (Sigma)

#### **4.1.3. Reagentes para eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, revelação do gel pela pratae Comassie eCromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Anexo I

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1. Análises Físico Químicas**

#### **4.2.1.1 Caracterização da matéria prima vegetal**

O material vegetal utilizado, partes aéreas de *P. umbellata*(L.) Miq., foi adquirido moído do Sitio da Mata, Rod. Cajuru / Cassia dos Coqueiros- São

Paulo. Lote 01SDM, coletado em 06/01/2009, conforme laudo em anexo (Anexo II).

#### 4.2.1.2. Determinação do pH

Foram preparadas três soluções aquosas a 1% com a droga de *P. umbellata*, adotando o seguinte procedimento: 99,00 g de água foram colocados em erlenmeyer e levados a chapa-elétrica para ebulição durante 5 minutos. Em seguida, a água foi vertida sobre 1,00 g das drogas, o recipiente foi fechado e deixado em infusão por 15 minutos. Após este tempo, as misturas foram filtradas e depois de esfriarem, foi feita a leitura do pH em peagômetro calibrado. Determinou-se também o pH da água destilada utilizada nos testes. Os resultados equivalem à média de três determinações.

#### 4.2.1.3. Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,00 g da droga vegetal moída foi exatamente pesada e submetida à decocção com 100,00 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL e a solução resultante foi filtrada em papel de filtro, sendo os primeiros 20 mL desprezados. Do restante do filtrado foi pesada uma alíquota equivalente a 20,00 g, em pesa-filtro tarado e evaporado até ficar seco em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi colocado em balança dessecadora à temperatura de 110°C até peso constante (DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1994).

O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo equação abaixo:

$$TE = g.FD.100 / m$$

onde: TE = teor de extrativos (%; m/m) ; g= massa do resíduo seco (g); m= massa da amostra (g); FD= fator de diluição (5)

#### 4.2.1.4. Granulometria

Amostras, de 25,00 g de *P. umbellata*, foram pesadas e colocadas sobre os tamises de abertura nominal da malha de 420, 250, 177, 125 e 77 µm com tampa e recipiente coletor. Os tamises foram colocados em dispositivo mecânico durante 30 minutos. Os pós remanescentes em cada tamis e o

recolhido no recipiente coletor, foram pesados. Os resultados equivalem à média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### **4.2.1.5. Perda por dessecação em balança com infravermelho**

Para a determinação da perda por dessecação, foram pesadas 4,00 g da planta seca em balança com infravermelho e submetidas a temperatura de 110°C pelo período de aproximadamente uma hora. Após este período, foi feita a leitura do peso, a qual foi repetida a cada uma hora até que o peso das amostras não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (%; p/p) e equivalem à média de três determinações segundo Vigo et al., (2004), com modificações.

#### **4.2.2. Triagem fitoquímica:**

A triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários de *P. umbellata* foi realizada segundo metodologias adaptadas de Costa (1994).

##### **4.2.2.1. Pesquisa de saponinas**

Foram fervidos 2,00 g de *P. umbellata* com 10 mL de água deionizada durante 3 minutos, filtrando através de algodão para um tubo de ensaio, o qual foi agitado no sentido vertical e vigorosamente durante 20 segundos. Após repouso de 20 minutos, para o teste ser considerado positivo deverá ocorrer a apresentação de espuma persistente no tubo que não deve desaparecer com a adição de 1 mL de HCl 2 N.

##### **4.2.2.2. Pesquisa de Taninos**

Foram preparados decoctos com 5,00 g de *P. umbellata* em 100 mL de água deionizada.

###### **4.2.2.2.1. Taninos em cloreto férrico em metanol**

A 2 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de água deionizada e 2-4 gotas de solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) a 1% em metanol. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos

hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

#### **4.2.2.2.2. Taninos em acetato de chumbo**

A 5 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

#### **4.2.2.3. Pesquisa de Antraquinonas**

##### **4.2.2.3.1. Pesquisa de Antraquinonas livres**

Foi agitado 1,00 g de *P. umbellata* com 10 mL de éter etílico, filtrando posteriormente. À solução etérea, foi adicionado 1 mL de amônia diluída, agitando. A camada aquosa deve tornar-se rósea para resultado positivo.

##### **4.2.2.3.2. Pesquisa de Glicosídeos Antraquinônicos**

Ao pó seco, foi adicionado 20 mL de água, fervendo por 5 minutos. A mistura foi resfriada e filtrada, juntando 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30% ao filtrado; após fervura por 5 minutos, foi esfriada e filtrada, sendo feitas duas extrações com 5 mL de éter etílico. Foram unidas as fases etéreas agitando com 3 mL de amônia diluída. Para resultado positivo, a camada aquosa deve tornar-se rósea.

#### **4.2.2.4. Pesquisa de Flavonóides**

Foram tratados 3,00 g de *P. umbellata* com 20 mL de éter de petróleo sob aquecimento em banho de aquecimento. Após filtrados, foram adicionados 20 mL de metanol ao material vegetal residual, aquecendo em banho de aquecimento, com posterior filtração e evaporação. Ao final, o resíduo foi recuperado com 10 mL de etanol.

##### **4.2.2.4.1. Reação de Shinoda**

Foram colocados 1 mL do extrato final em tubo de ensaio e foi adicionado um fragmento de magnésio metálico, foram colocadas gotas de



ácido clorídrico concentrado. Após o desprendimento de hidrogênio nascente, há o aparecimento de coloração rósea ou vermelha.

#### **4.2.2.4.2. Reação do Cloreto Férrico**

Foram adicionadas, a 1 mL do extrato, algumas gotas de cloreto férrico a 2%. Dependendo do flavonóide presente, pode aparecer coloração verde (flavonas) ou amarelo (chalconas) ou ainda violáceo (flavonóis, flavonas).

#### **4.2.2.4.3. Reação do Cloreto de Alumínio**

Foram umedecidas áreas diferentes de papel de filtro com o extrato. Foi colocada sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. Deve-se observar sob luz ultravioleta a intensificação da fluorescência ou fluorescência verde-amarelada (isoflavonas), amarela (flavonóis, flavonóis), azul-esverdeado (chalconas) ou amarelo acastanhado (isoflavonas) dependendo do flavonoide presente.

#### **4.2.2.4.4. Reação de Pew**

Foram evaporados, em banho de aquecimento, 3 mL do extrato em tubo de ensaio até a secura; ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Foram colocadas algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. Deve aparecer coloração vermelha para a presença de flavonoides da classe das flavonas, flavonóis e flavononas.

#### **4.2.2.4.5. Reação de Taubock**

Foram evaporados, em banho de aquecimento, 3 mL do extrato até secura, esfriando e umedecendo o resíduo com algumas gotas de acetona. Foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Foram evaporados, em banho de aquecimento, novamente, até a secura evitando aquecimento prolongado. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a mistura foi observada sob luz ultravioleta (254 nm). Em caso positivo, ocorre aparecimento de fluorescência amarelo esverdeada.

### 4.2.3. Preparação dos Extratos Vegetais e Frações

A partir do material vegetal seco e moído, foram preparados os extratos EtOH 70, EtOH 50, Aquosoextrato hexânico, extrato hexano/acetato de etila e extraído óleo essencial. O extrato EtOH 70 foi submetido a fracionamento conforme descritos nos itens 4.2.3.1.1. a 4.2.3.1.5. e demonstrado na figura 10.

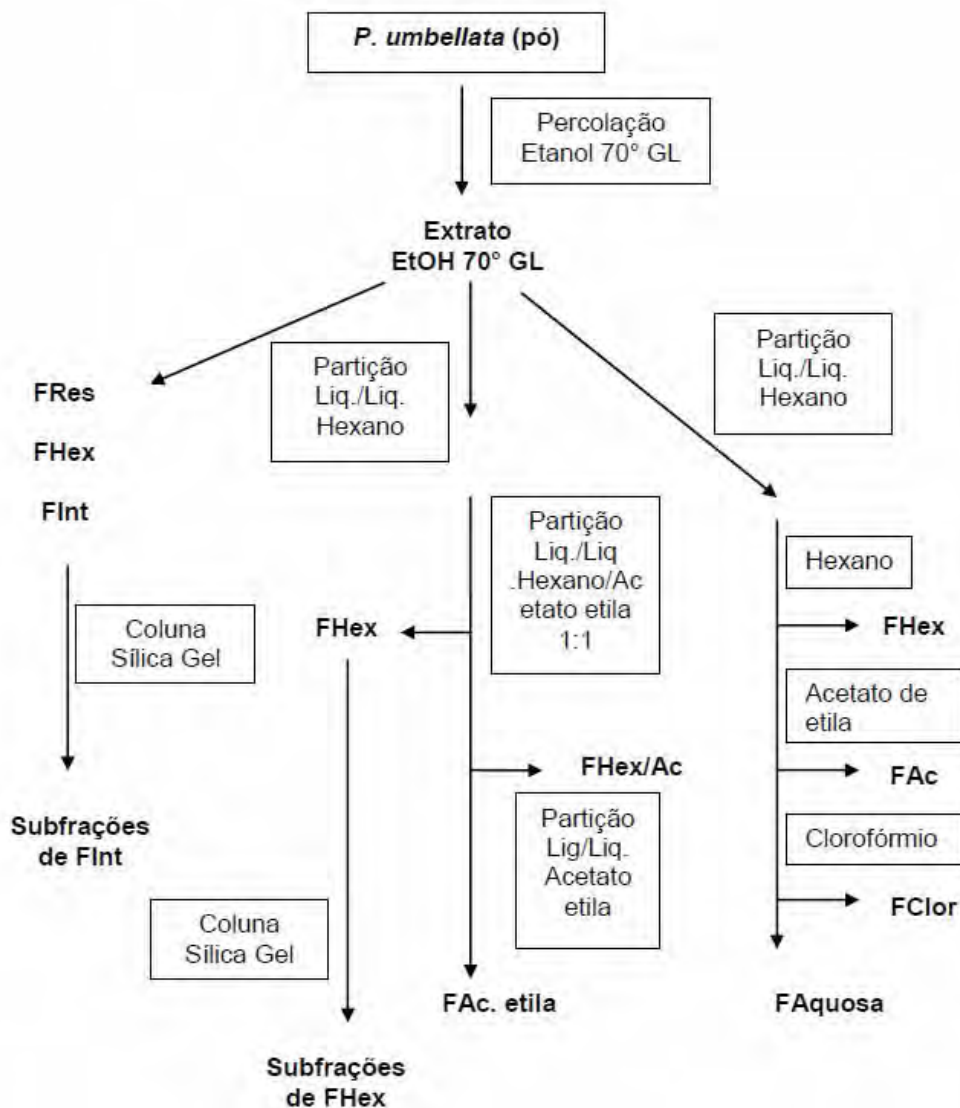


Figura 10: Fluxograma da preparação de extratos e frações de *P. umbellata*

#### 4.2.3.1. Preparação dos Extratos Hidroalcoólicos

O extrato vegetal foi preparado por percolação, segundo o processo geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1926. Foram

utilizados como solventes extratores etanol 70° GL (EtOH 70) ou etanol 50° GL (EtOH 50). Foram utilizados 100 g da planta seca e moída para cada percolação, que foi inicialmente intumescida com 400 ml do solvente por 4 horas e então transferida para o percolador. A percolação foi realizada por 7 dias, com uma vazão de aproximadamente 0,4 ml/min. Utilizando-se de 2600 ml do solvente. Após a percolação parte dos extratos foram concentrados em rotaevaporador, secos a temperatura ambiente e armazenados ao abrigo da luz.

#### **4.2.3.1.1. Partição líquido/líquido do Extrato Etanólico 70° GL com Hexano – Fracionamento I**

Uma porção de 8,0 g extrato EtOH 70 seco, foi misturado a 400mL de água. A mistura foi colocada em funil de separação, em seguida adicionou-se 400 mL de hexano (3X). Após a separação das fases foram obtidas a fase aquosa, uma fase intermediária e a fase hexânica. A fase intermediária foi seca a temperatura ambiente, as fases aquosa e a hexânica foram concentradas e secas em rotaevaporador, dando origem a FRes, FInt, e FHex, respectivamente.

#### **4.2.3.1.2. Partição líquido/líquido do extrato etanólico 70° GL- Fracionamento II**

Uma porção de 1,5 g do extrato etanólico 70° GL, foi dissolvida em 50 mL de água e colocada em um funil de separação, adicionou-se 50 mL de hexano misturou-se e o funil foi deixado em repouso, formando 2 fases, uma hexânica e outra aquosa. Recolheu-se a fase hexânica e reservou-se (este procedimento foi realizado 3 vezes). À fase aquosa foi adicionado 50 mL de hexano/acetato de etila 1:1(v/v), misturou-se e o balão foi deixado em repouso, formando 2 fases, uma superior (hexano/acetato de etila 1:1) e uma inferior (aquosa), recolheu-se a fase superior e reservou-se, (este procedimento foi realizado 3 vezes). Ao restante da fase aquosa adicionou-se 50 mL de acetato de etila, misturou-se, o balão foi deixado em repouso, formando 2 fases, uma superior (acetato de etila) e uma inferior (aquosa), recolheu-se a fase acetato de etila e reservou-se (este procedimento foi realizado 3 vezes). Cada uma das fases obtidas foi concentrada em rotaevaporador e seca a temperatura

ambiente, dando origem a Fração Hexano (FHex), Fração Hexano/Acetato de Etila (F Hex/Ac), Fração Acetato de etila (FAc Etila).

#### **4.2.3.1.3. Fracionamento da fração hexano por cromatografia em coluna- Fracionamento III**

A fração hexano do fracionamento I foi fracionada em coluna de vidro de 30 x 150 mm, contendo (45 g) sílica gel 60 (40-140 Mesh), utilizando a seguinte sequência de eluentes: hexano, hexano/acetato de etila 9:1(v/v), 8:2 (v/v), 1:1(v/v), acetato de etila e metanol, sendo utilizado 200 mL de cada eluente. Para cada eluente foram recolhidas 6 sub-frações.

#### **4.2.3.1.4. Partição líquido/líquido do Extrato Etanólico 70° GL – Fracionamento IV**

Uma porção de 35 g extrato seco EtOH 70 GL, foram misturados a 400mL de água colocada em funil de separação, adicionou-se 400 mL de hexano, misturou-se e o funil foi deixado em repouso, formando 2 fases, uma hexânica e outra aquosa. A fase hexânica (FHex) que foi concentrada em rotaevaporador e seca. A fase aquosa foi recolhida e reservada, sendo realizada extração com os solventes: Hexano, Acetato de etila e Clorofórmio.

Recolheu-se a fase hexânica reservou-se (este procedimento foi realizado 3 vezes). À fase aquosa foi adicionado 400 mL de acetato de etila, misturou-se e o balão foi deixado em repouso, formando 2 fases, uma superior (acetato de etila) e uma inferior (aquosa), recolheu-se a fase superior e reservou-se (este procedimento foi realizado 3 vezes). Ao restante da fase aquosa adicionou-se 400 mL de clorofórmio, misturou-se, o balão foi deixado em repouso, formando 2 fases, uma superior (clorofórmica) e uma inferior (aquosa), recolheu-se a fase clorofórmica e reservou-se (este procedimento foi realizado 3 vezes). Cada uma das fases obtidas foi concentrada em rotaevaporador e seca a temperatura ambiente, dando origem a Fração hexano (FHex), Fração acetato de etila (FAc), Fração clorofórmio (FClor).

#### **4.2.3.1.5 Fracionamento da fração Intermediária do fracionamento I (Flnt) por cromatografia em coluna- Fracionamento V**

A fração Intermediária (Flnt) foi sub fracionada em coluna de vidro de 30 x 120 mm, contendo (18,5 g) sílica gel 60 (40-140 Mesh), para tanto 1,65 g de Flnt foi misturada a uma pequena porção de sílica gel 60 com auxílio de gral e pistilo e então transferida para a coluna. Utilizou-se a seguinte sequência de eluentes: hexano, hexano/acetato de etila 9:19 (v/v), 85:15 (v/v), 83:17 (v/v), 8:2 (v/v), 78:22 (v/v), 75:25 (v/v), 7:3 (v/v), 1:1 (v/v), sendo utilizado 75 mL de cada eluente. A cromatografia foi realizada sob pressão positiva.

#### **4.2.3.2. Preparação do extrato aquoso**

A preparação do extrato aquoso foi realizada por infusão. Em um Becker foram colocados 100g da planta seca e moída, adicionado 400 ml de água fervente, sendo o frasco tampado com um vidro relógio. Após 30 minutos a mistura foi filtrada e o filtrado obtido foi liofilizado.

##### **4.2.3.2.1. Preparação do extrato aquoso infusão (inf)**

A preparação do extrato aquoso inf foi realizada por infusão. Em um Becker foram colocados 25g da planta seca e moída, adicionado 100 ml de água fervente, sendo o frasco tampado com um vidro relógio. Após 30 minutos a mistura foi filtrada e o filtrado obtido foi separado em alíquotas de 2 mL e congelado.

##### **4.2.3.3. Preparação do extrato hexânico**

O extrato hexânico foi preparado por maceração, onde foram pesados 50 g da planta seca e moída e adicionados 400 mL de hexano, deixando em repouso por 4 horas, após este período coletou-se a e adicionou-se mais 150 mL de hexano ao pó, após 24 horas o material foi filtrado. O extrato foi concentrado em rotaevaporador, seco a temperatura ambiente e armazenado ao abrigo da luz.

##### **4.2.3.4. Preparação do extrato hexano/Acetato de etila**

O extrato hexano/Acetato de etila (Ext. hex/ac) foi preparado por maceração, onde foram pesados 50 g da planta seca e moída e adicionados

400 mL de hexano/acetato de etila (1:1), deixando em repouso por 4 horas, após este período coletou-se e adicionou-se mais 150 mL de hexano/ Ac. etila ao pó, após 24 horas o material foi filtrado. O extrato foi concentrado em rotaevaporador, seco a temperatura ambiente e armazenado ao abrigo da luz.

#### **4.2.3.5.Extração do óleo essencial**

O óleo essencial foi extraído pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, utilizando-se 100 g de partes aéreas da planta seca que foram colocadas em balão de 2000 mL, adicionado água (até a metade do balão) e aquecidos em manta aquecedora. O tempo de extração foi de 3 horas, após este período o óleo foi coletado em um Becker, previamente tarado, determinado o seu peso e volume.

#### **4.2.3.6. Obtenção da Substância 1**

A Substância 1 (Subs. 1) foi obtida após Cromatografia em Camada Delgada Preparativa. As frações onde, após CCD, foram encontradas manchas com  $R_f$  e cor semelhantes ao padrão de 4-NC, foram aplicadas em placas cromatográficas preparativas de sílica gel (20 x 20 cm) com 1mm de diâmetro e desenvolvidas utilizando como eluente hexano/acetato de etila 7:3 (v/v). Após o desenvolvimento a placa foi coberta com outra placa de vidro deixando uma faixa horizontal para ser revelada com anisaldeído, afim de marcar o local referente ao 4-NC. Após determinado a região onde esta presente o 4-NC, esta foi raspada, a sílica recolhida em um frasco, adicionado metanol e filtrado afim de separar a sílica, no filtrado esta presente a subs. 1. Para confirmar a presença da substância foi realizada uma CCD com padrão de 4-NC. A amostra foi enviada para análise por espectrometria de Ressonância Magnética (RMN) de  $^1\text{H}$ .

#### **4.2.3.7.Obtenção da Substância 2 (Subs. 2)**

Após o fracionamento V, observou-se a presença de cristais em alguns frascos. Adicionou-se metanol ao frasco retirando-se a parte líquida e permanecendo os cristais, estes foram reservados para testes biológicos e enviados para análise por espectrometria de Ressonância Magnética (RMN) de  $^1\text{H}$ .

#### **4.2.4. Análise Cromatográfica**

##### **4.2.4.1. Triagem Cromatográfica em Camada Delgada**

As frações obtidas do fracionamento em coluna foram analisadas por CCD. Como fase móvel foram utilizados: hexano/acetato de etila 7:3 (v/v), 1:1 (v/v), acetato de etila/etanol 6:4 (v/v), n-butanol, ácido acético e água (BAW) 6:1:2 (v/v/v). Como revelador foi utilizado anisaldeído sulfúrico, as placas foram observadas também em presença de luz ultra violeta com comprimento de onda de 365 nm.

##### **4.2.4.2. Identificação dos constituintes químicos por CG-EM**

As constituições químicas dos óleos essenciais e das frações F2 e F2C foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em aparelho Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar. Para a dissolução das amostras foi utilizado hexano grau HPLC.

##### **4.2.4.2.1. Identificação de substâncias presentes nas frações F2 e F2Ce**

###### **óleo essencial**

A identificação dos constituintes químicos das frações F2 e F2C, originadas do fracionamento de FHex (fracionamento III) e do óleo essencial foi realizada conforme descrito a seguir.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, a uma vazão constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240 °C e o volume de injeção foi de 0,1 µL. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C/min. Para a padronização dos tempos de retenção foi adicionada à cada amostra uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>). Os índices de retenção de Kovats (IR) foram calculados de acordo com a equação 1,



(Equação 1)

$$IR = 100 Z + 100 \frac{\log t' R (x) - \log t' R (z)}{\log t' R (z+1) - \log t' R (z)}$$

Onde Z é o número de carbonos do primeiro hidrocarboneto da mistura de padrões cujo tempo de retenção  $t'R(z)$  é imediatamente menor que o tempo de retenção  $t'R(x)$  do constituinte do óleo essencial, e  $t'R(z+1)$  é o tempo de retenção do hidrocarboneto da mistura de padrões imediatamente maior (COLLINS et al., 2006; ADAMS, 2007). Os valores de IR obtidos foram comparados com os da literatura.

A amostra eluída da coluna cromatográfica foi direcionada pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 280°C e a energia do feixe de elétrons foi de 70eV. O analisador foi controlado para separar íons de  $m/z$  entre 40 e 600. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem. A identificação de cada constituinte químico presente no óleo essencial foi feita com base na combinação entre os valores de IR e de IS.

Para a determinação da densidade do óleo essencial foi utilizada a equação 2, dividindo a massa em g pelo volume em mL.

(Equação 2)  $d = m/v$

#### 4.2.4.3. Identificação de substâncias por APCI-IT-MS

A identificação da substância 1, 4-Nerolidilcatecol, foi realizada em equipamento do laboratório multiusuário do Instituto de Química da UNESP Araraquara.



#### 4.2.4.3.1. Preparo das amostras para análises por APCI-IT-MS:

Para as análises por APCI-IT-MS da substância 1, 1 mg foi dissolvido em metanol grau HPLC (3 mL), filtrada primeiramente em cartucho sepak RP-18 e posteriormente filtrada em um disco de membrana de Nylon da (Flow Supply) com 22,25 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poro.

#### 4.2.4.3.2. Análise por APCI-IT-MS:

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific, equipado com um dispositivo de inserção direta de amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de *Ionização Química a Pressão Atmosférica* (APCI) injetada em um fluxo de 10 µL/min. O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -20 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 275 °C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) fluxo 100 u (unidades arbitrárias), vaporizador 350° C, descarga da corona 3 kV, gás auxiliar (N<sub>2</sub>) 5u, gás de varredura 5u, lente do tubo -100v. A faixa de aquisição foi *m/z* 100-400, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

#### 4.2.4.3. Espectrometria de Ressonância Magnética (RMN)

O espectro de ressonância magnética (RMN) de hidrogênio (<sup>1</sup>H), foi obtido em espectrômetro Varian Inova 500MHz, dotado de probe direta 5 mm, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O experimento foi realizado a temperatura 28°C sendo amostra foi diluída em clorofórmio deuterado. Foi utilizado Tris como padrão inerte.

#### 4.2.5. Linhagens fúngicas

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens fúngicas cujas origens estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Linhagens fúngicas

Linhagem	Denominação	Isolada/cedida
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tr1	Isolado clínico cedido pela Prof <sup>a</sup> Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tr FOC	Cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, INCQS 40051
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tm	Cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, INCQS 40004
<i>Microsporum canis</i>	Mc	Isolado clínico cedido pela Prof <sup>a</sup> Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida

As linhagens foram mantidas em ágar Sabouraud ou ágar batata dextrose com repique de 15 em 15 dias.

#### 4.2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

##### 4.2.6.1. Diluição dos extratos vegetais

Para diluição dos extratos vegetais foram utilizados microtubos tipo Eppendorf usando como diluente DMSO. Os extratos foram diluídos a uma concentração de 50 mg/mL. A partir dos extratos diluídos em DMSO foram preparadas soluções mães em meio RPMI com 2% de glicose tamponado em MOPS pH 7,2, de modo a obtermos uma concentração de 5mg/mL.

##### 4.2.6.2. Preparo do inóculo

As linhagens foram desenvolvidas em placas com ágar Sabouraud por 7 dias. Após o desenvolvimento raspou-se as colônias com auxílio de um fio de platina em L, colocando-as em tubo cônico contendo 3 mL de salina estéril. Após este procedimento misturou-se em vortex por aproximadamente 3 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustando o número de células para que se fosse obtido um número final de  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL em meio RPMI.

#### 4.2.6.3. Determinação do CIM

Para determinação da concentração inibitória mínima foi utilizada adaptação da metodologia segundo norma aprovada CLSI M38-A (NCCLS, 2002). Para tanto foram utilizadas microplacas de 96 poços, que contém 8 linhas e 12 colunas. O meio de cultura utilizado foi o meio RPMI com 2% de glicose tamponado em MOPS pH 7,2 . A coluna 1 foi usada para o controle negativo do teste onde havia apenas o meio de cultura (200  $\mu$ L). A coluna 12 foi considerada como controle positivo onde foram inoculados apenas 100  $\mu$ L da suspensão de células ( $5,0 \times 10^3$  UFC/mL) e 100  $\mu$ L do meio. Em cada poço nas colunas 2 a 11 foram adicionados 100  $\mu$ L do meio, na coluna 2 foram colocados 100 $\mu$ L do extrato vegetal, homogeneizado e retirados 100 $\mu$ L passando para a coluna 3; desta também foram retirados 100 $\mu$ L e repassados a coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 11, onde após homogeneização foram retirados 100 $\mu$ L e descartados, obtendo-se então a diluição do extrato vegetal, posteriormente foram colocados 100 $\mu$ L da suspensão de células em concentração  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL em cada poço nas colunas 2 a 12. O esquema da placa está demonstrado na Figura 11.

A determinação da CIM foi realizada por leitura visual, observando presença ou ausência de turvação após incubação da placa em estufa a 28°C por 7 dias e também utilizando-se resazurina 1% como revelador, onde a mesma quando reduzida apresenta coloração rosa, demonstrando que as células estão vivas, e oxidada tem coloração azul, quando as células estão mortas

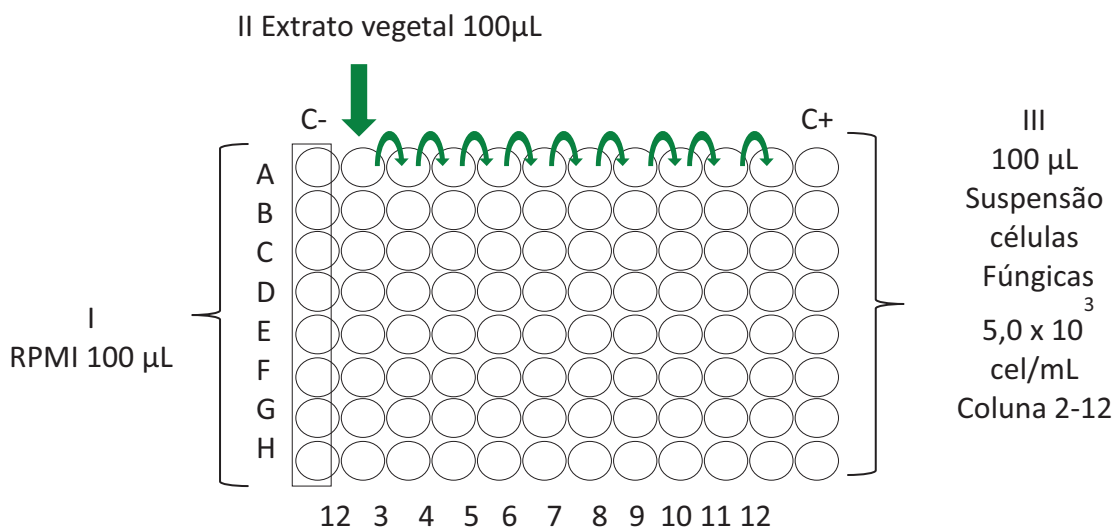


Figura 11: Esquema da placa para determinação da CIM

#### **4.2.7. Determinação da toxicidade**

##### **4.2.7.1. Determinação da citotoxicidade “*in vitro*”**

A citotoxicidade “*in vitro*” foi realizada frente a fibroblastos da córnea de coelho SIRC ATCC CCL60 e macrófagos J774. Estas células foram mantidas em garrafas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1640 (pH 7) adicionado de 10% soro fetal. Ao acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina e 0,1% de solução de anfotericina B.

##### **4.2.7.1.1. Preparo das amostras**

Os extratos de *P. umbellata* foram dissolvidos em DMSO a fim de obter uma solução de 100 mg/mL, sendo posteriormente diluídos 1:20 (v/v) em RPMI-1640 e aplicado ao primeiro poço da microplaca de 96 poços, sendo então diluídos, sucessivamente, até o último poço da placa, 1:1 (v/v) em RPMI-1640. A faixa de concentração no ensaio foi de 2000 µg/mL e a mínima foi de 15,625 µg/mL.

##### **4.2.7.1.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos**

A técnica consistiu em coletar as células por tripsinização, centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos e contagem do número de células, com auxílio do corante Turk, ajustando para a concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI-1640. Desta suspensão, as células foram incubadas em microplaca de 96 poços a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. Após este período, observou-se a formação de tapete celular, retirou-se o meio RPMI existente (já inadequado para a manutenção celular), colocando 100 µL de meio novo e 100 µL das amostras já preparadas. Incubou-se a microplaca por 24 h a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Todo esse procedimento foi feito de forma a causar a menor perturbação possível ao tapete celular formado. Posteriormente, adicionou-se 20 µL do corante resazurina diluído em RPMI-

1640 1:1 (v/v). Novamente, incubou-se a microplaca em estufa sob atmosfera a 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C para leitura após 5 a 24 h. A coluna 11 foi utilizada como controle negativo, sem a presença de células e a coluna 12, como controle positivo do crescimento celular. Uma coluna foi utilizada como controle de citotoxicidade do DMSO, sendo diluído 1:1 (v/v) em RPMI-1640 no primeiro poço com subsequente diluição 1:1 no mesmo meio. A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) (AHMED et al., 1994; O'BRIEN et al., 2000; DEBBASCH et al., 2005 com modificações).

#### **4.2.7.2.Determinação da toxicidade “*in vivo*”**

A toxicidade *in vivo*, foi realizada em camundongos Swiss machos. Nestes animais foram administrados por gavagem 2 g/Kg do extrato EtOH 70 e/ou da partição hexano do EtOH 70, os animais foram observados inicialmente nos tempos de 0, 30, 60, 120 minutos e após 24 h por 7 dias. Após os experimentos os animais foram sacrificados em câmara com éter.

O experimento recebeu parecer favorável da Comissão de Ética do Uso de Animais da FCFAR conforme anexo III.

#### **4.2.8.Quantificação do ergosterol**

O ergosterol foi quantificado conforme metodologiadescrita a seguir. Após incubação de cada linhagem fúngica ( $5,0 \times 10^3$  cel/mL), em caldo Sabouraud por 7 dias a 28°C, com agitação de 120 rpm, foram adicionados os antifúngicos ou FHex de *P. umbellata*, conforme valores demonstrados na tabela 3, os frascos foram novamente colocados sob agitação (120 rpm) por 7 dias a 28°C. Um frasco controle com o fungo foi mantido por 14 dias nas mesmas condições.

Após os procedimentos acima, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min e o sedimento celular formado foi submetido a processo de lise com solução alcoólica de KOH 25% e aquecimento. O ergosterol removido por partição entre água e hexano e agitação. A fase hexano, após diluição 1:5 em álcool, foi submetida a leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro Shimadzu (mod. UV 1603) entre 200 e 300 nm. A presença de ergosterol e de seu último intermediário fornece um espectro com quatro bandas, sendo que a

altura dos mesmos é correspondente à concentração dos esteróis. A concentração dos mesmos é calculada com base no peso das células iniciais e absorvâncias obtidas (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002).

Tabela 3: Concentração da fração hexano e voriconazol utilizada no ensaio de quantificação do ergosterol

	Linhagem Tr1	Linhagem Mc
FHex	976 µg/ml	976 µg/ml
Voriconazol	12,5 µg/ml	400 µg/ml
Fluconazol	50,0 µg/ml	400 µg/ml

O conteúdo de ergosterol foi calculado como porcentagem em relação ao peso do precipitado (pellet), de acordo com as equações:

$$(1) \% \text{ ergosterol} = \frac{(A_{281,5}/290) \times F}{\text{peso do pellet}} \times 100$$

$$(2) \% \text{ 24(28) DHE} = \frac{(A_{230}/518) \times F}{\text{peso do pellet}} \times 100$$

$$(3) \% \text{ ergosterol} = (1) - (2)$$

Onde,

F= fator de diluição em etanol

290= valor  $E$ , em porcentagem por cm, determinado para o ergosterol cristalino.

518=valor  $E$ , em porcentagem por cm, determinado para o 24(28) DHE cristalino.

#### 4.2.9. Avaliação de alterações em proteínas fúngicas

##### 4.2.9.1. Estabelecimento da curva de crescimento

Após o desenvolvimento das linhagens do *T. rubrum*(Tr1) e *M. canis* (Mc) em placas de Petri com ágar batata dextrose, os micélios foram raspados e transferidos para 3 mL de solução salina estéril. Após contagem do número de células, transferiu-se quantidades suficientes para um frasco estéril com 100 mL de meio Sabouraud líquido de modo que neste meio se obtivesse uma concentração de  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Para cada linhagem foram preparados 2

frascos (Erlenmeyer) que foram incubados em estufa sob agitação de 120 rpm, a 28° C, por 7 e 14 dias (controle 7 e 14 dias). Após este período, filtrou-se o meio contendo o fungo em papel de filtro estéril e em ambiente estéril, obtendo-se o filtrado e a massa celular que foi coletada e pesada. No filtrado estão presentes as proteínas exocelulares e na massa celular, as proteínas endocelulares. Os filtrados exocelulares ou extratos exocelulares (metabólitos) foram utilizados para a eletroforese.

#### **4.2.9.2 Obtenção dos extratos protéicos frente aos extrativos vegetais e aos agentes antifúngicos**

Após o desenvolvimento das linhagens do *T. rubrum*(Tr1) e *M. canis* (Mc) em placas de Petri com ágar batata dextrose, os micélios foram raspados e transferidos para 3 mL de solução salina estéril. Após contagem do número de células, transferiu-se quantidade suficiente, para um frasco estéril com 100mL de meio Sabouraud líquido de modo que neste meio se obtivesse uma concentração de  $5 \times 10^3$  UFC/mL. As linhagens fúngicas foram cultivadas por 7 dias em estufa com agitação a 120 rpm, a 28° C e então adicionado extrato vegetal ou antifúngicos na concentração de 100 vezes a CIM previamente determinada, permanecendo em incubação por mais 7 dias em estufa com agitação a 120 rpm, a 28° C. Após este período, foi filtrado o meio contendo o fungo em papel de filtro estéril e em ambiente estéril, obtendo-se o filtrado e a massa celular, como descrito no item anterior. As condições oriundas deste tratamento foram identificadas como FHex + 7, Voriconazol + 7 e Fluconazol +7.

#### **4.2.9.3. Análise do perfil proteico**

##### **4.2.9.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

O perfil protéico dos filtrados de cultura das linhagens foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com gel de empilhamento de 5% e gel de separação de 12% (LAEMMLI, 1970). Os géis foram confeccionados utilizando-se placa de vidro medindo 10 x 10 x 0,075 cm. As concentrações dos reagentes e quantidades



necessárias estão descritas nas tabelas 4 e 5. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3 e a voltagem utilizada foi de 80 V até a penetração no gel de separação e, a seguir, 120 V até o final do gel. Os géis foram revelados pela Prata. Para aplicação nos géis as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford.

Tabela 4: Gel de separação a 12%

Reagentes	Quantidade
Água MilliQ	6,6 mL
Acrilamida 30%	8,0 mL
Tris HCL 1,5M pH 8,8	5,0 mL
SDS 10%	200 µL
Persulfato de Amônio 10%	200 µL
Temed	8 µL

Tabela 5: Gel de Empilhamento a 5%

Reagentes	Quantidade
Água MilliQ	5,5 mL
Acrilamida 30%	1,3 mL
Tris HCL 1,0M pH 6,8	1,0 mL
SDS 10%	80 µL
Persulfato de Amônio 10%	80 µL
Temed	8 µL

#### 4.2.9.3.2. Análise Protéica por Eletroforese Bidimensional

Os filtrados fúngicos foram primeiramente submetidos à focalização isoeétrica, utilizando IPGphor 3 (GE Healthcare) em fita Immobiline DryStrip pH 3-10 NL 13 cm (GE Healthcare). As proteínas do filtrado fúngico foram quantificadas pelo método de Bradford e precipitadas em solução a 10% de ácido tricloroacético em acetona 90% por 12 horas a 4°C, de modo a obter 300 µg de proteínas. A segunda dimensão, realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12.5% de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram revelados pela prata. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa 2D Platinum da GE Healthcare.



Estes experimentos foram realizados no laboratório de micologia do departamento de análises clínicas da FCFAR UNESP, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Marisa Fusco-Almeida.

#### **4.2.9.3.3. Análise Protéica por Zimografia (protease)**

A zimografia para análise de proteases foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 7,5% (gel de separação) adicionado de gelatina (2mg/mL), utilizando-se um gel de empilhamento a 5 %. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3 e a voltagem utilizada foi de 80 V até a penetração no gel de separação e, a seguir, 120 V até o final do gel em placa de Mini gel de 10 x 10 x 0,075 cm. Foram aplicados 30 µL do filtrado fúngico (sem fervura) por poço. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3 e a voltagem utilizada foi de 80 V até a penetração no gel de separação e, a seguir, 120 V até o final do gel. Após a eletroforese o gel foi lavado 2 vezes com Triton X-100 a 2,5% para remoção do SDS e então incubado com tampão (Tris HCL 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5) a 37°C por 24 horas. O gel foi corado com Azul de Coomassie G 250 (0,1%) e descorados com solução contendo metanol 50% e ácido acético 10%. A atividade enzimática foi observada devido ao aparecimento de bandas claras, referentes a ação sobre o substrato de gelatina.

#### **4.2.10. Teste de inibição da germinação de esporos**

A linhagem fúngica foi desenvolvida em placas com ágar Batata Dextrose por 14 dias. Após o desenvolvimento raspou-se as colônias com auxílio de um fio de platina em L, colocando-as em tubo cônico contendo 3 mL de salina estéril. Após este procedimento misturou-se em vortex por aproximadamente 3 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustando o número de células para que se obtivesse um número final de 2,0-3,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Em microplacas de 96 poços, foi colocado 90 µL de RPMI em cada poço, na coluna 2 foi colocado 90 µL de extrato vegetal, (concentração de 5000 µg/mL previamente diluído em meio RPMI) misturado e transferido 90 µL para coluna 3, este procedimento foi realizado até a coluna 12

(diluição seriada). Colocou-se então 10 µL da suspensão de células fúngicas (contendo 2000 a 3000 células) em todos os poços da placa. Na coluna 1 temos o controle de crescimento, nos poços das colunas 2 a 12 as diferentes diluições dos extratos vegetais ou antifúngicos. As placas foram incubadas a 30° C por 24 horas e observadas em microscópio invertido. Os esporos foram considerados germinados quando apresentaram um tubo germinativo de pelo menos duas vezes o comprimento do esporo. A metodologia foi adaptada de Koroishiet al. (2008).

#### 4.2.11. Sinergismo

Os testes de sinergismo foram realizados em placas de 96 poços (Elisa) com meio RPMI contendo 2% de glicose tamponado em MOPS pH 7,2. Em tubos estéreis foram preparadas diluições com várias concentrações de material vegetal e antifúngicos. Na linha A, a partir da coluna 2 até a coluna 11 foram colocados 50 µL das diversas concentrações do extrato vegetal, da mesma forma o antifúngico foi colocado na coluna 12. Em todos os poços foram colocados 50µL do meio RPMI e 100 µL da suspensão de células ( $5,0 \times 10^3$  UFC/mL), com exceção da coluna 1 de A até D, onde foi colocado apenas o meio de cultura (controle negativo) e de E até H onde foi colocado meio de cultura e a suspensão de fungos (controle positivo). A leitura do sinergismo foi realizada por leitura visual após incubação da placa em estufa a 28°C por 7 dias. O esquema da figura 12 demonstra a placa de microdiluição, onde em negrito estão demonstradas as respectivas concentrações dos antifúngicos e em itálico as concentrações dos extratos vegetais testados.

Para verificar o efeito combinatório, utilizou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que é calculado a partir da soma da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) da substância 1 + CIF da substância 2. Para calcular o CIF, dividiu-se a CIM das substâncias em combinação pela CIM da substância isolada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
B		2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	

		312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
C		2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
		156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2
D		2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
		78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12
E		2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
		39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06
F		2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
		19,53	19,53	19,53	19,53	19,53	19,53	19,53	19,53	19,53	19,53	19,53
G		2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
		9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76
H	C+	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
		4,88	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88

Figura 12: Representação das concentrações dos extratos vegetais e antifúngicos na placa de microdiluição

#### 4.2.12. Análise do desenvolvimento de hifas

Em placas de Petri de 49 x 13 mm contendo meio ágar Sabouraud foi adicionado a fração FHex de modo a atingir a CIM previamente determinada e a concentração de 2 x e 4 x CIM (9,76 µg/mL, 19,53 µg/mL e 39,06 µg/mL respectivamente). Após a solidificação do meio de cultivo foi colocado um fragmento (15 x 15 mm) de saco dialise e sobre este 10 µL de uma suspensão de células fúngicas a uma concentração de  $5,0 \times 10^3$  células/mL. Após 5 dias o fragmento do saco de dialise foi removido, colocado sobre uma lâmina contendo uma gota de azul de lactofenol (azul de algodão) e analisado sob microscopia ótica nos aumentos de 20x e 40x.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análises físico-químicas

#### 5.1.1 Caracterização da matéria prima vegetal

##### 5.1.1.1. Determinação do pH

Após a realização da técnica em triplicata encontrou-se um valor de pH= 5,53. O pH da água determinado no mesmo experimento foi de 6,34.

##### 5.1.1.2. Determinação do teor de extrativos

Após a realização da técnica para determinar o teor de extrativos em triplicata encontrou-se um valor de 29,35

##### 5.1.1.3. Granulometria

Após a análise granulométrica em triplicata, obteve-se o resultado apresentado na tabela 6:

Tabela 6: Análise granulométrica

Tamis ( $\mu\text{m}$ )	%
>420	30,6
250-420	42,14
177-250	13,6
125-177	5
74-125	6,51
<74	0,86

##### 5.1.1.4. Perda por dessecação em balança com infravermelho

Após a determinação, a perda por dessecação foi de 8,275% do peso inicial.

### 5.2. Triagem fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica da droga vegetal estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7: Metabólitos secundários em *P. umbellata*

Classes	Reações	Resultado
Saponinas	Formação e permanência de espuma	Negativo
Taninos	Cloreto Férrico em metanol	Traços (taninos condensados)
	Acetato de chumbo	Positivo
Antraquinonas	Livres	Negativo
	Glicosiladas	Negativo
Flavonóides	Teste de Shinoda	Negativo
	Cloreto férrico	Positivo(verde flavonas)
	Cloreto de Alumínio	Traços (verde isoflavonas)
	Reação de Pew	Indeterminado
	Reação de Tawbock	Traços

Observa-se a presença de taninos e flavonóides (flavonas e isoflavonas).A presença de flavonóides também já foi evidenciada por JANUARIO (1994).

### 5.3.Obtenção dos extratos vegetais

#### 5.3.1 Obtenção do extrato etanólico70° GL (EtOH 70)

A partir de 100 g da planta seca, obteve-se, após a concentração em rotaevaporador e secagem,19,09 g do extrato etanólico, representando um rendimento de 19,09%.

##### 5.3.1.1. Fracionamento do Extrato Etanólico 70° GL (EtOH 70) com Hexano – Fracionamento I

Após o fracionamento com hexano obteve-se 1,7203 g da fração hexano, com rendimento de 21,50 %. O rendimento das rações FInt e FRes não foram determinados. Na figura 13 (A e B)demonstra-se o cromatograma das frações obtidas e na tabela 8o valor do fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas.

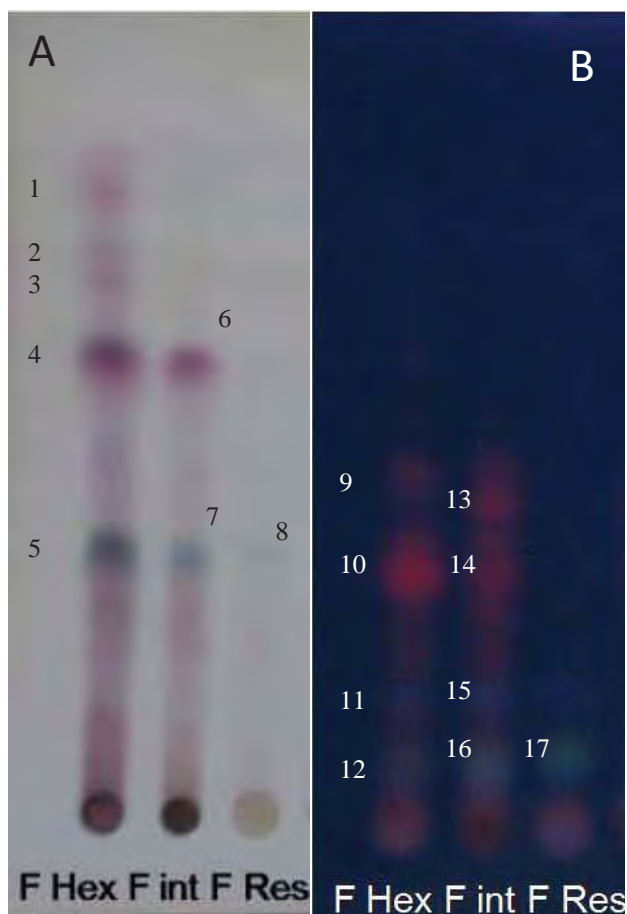


Figura 13 A e B: CCD das frações do extrato etanólico de *P. umbellata*. Fase móvel Ac. Etila/Etanol (6:4), revelador anisaldeído sulfúrico (A) e frente a luz UV (B).

Tabela 8: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 13

Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$
1	0,94	10	0,4
2	0,87	11	0,19
3	0,82	12	0,10
4	0,70	13	0,50
5	0,39	14	0,40
6	0,70	15	0,19
7	0,39	16	0,10
8	0,39	17	0,10
9	0,53		

### 5.3.1.2. Fracionamento líquido/líquido do extrato etanólico 70° GL- Fracionamento II

Após o fracionamento do extrato EtOH 70 (1,5 g) com hexano, hexano/Acetato de Etila 1:1, Acetato de etila, obteve-se os resultados demonstrados na tabela 9. A fração FHex/Ac apresentou o segundo maior rendimento proveniente do particionamento, sendo F Aquosa a que mostrou maior rendimento.

Tabela 9: Frações e rendimento do fracionamento do extrato etanólico 70° GL

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
FHex	0,0353	2,35
FHex/Ac	0,0471	3,14
FAc. Etila	0,0250	1,66
FAquosa	1,327	88,46

### 5.3.1.3. Fracionamento da fração hexano por cromatografia em coluna- Fracionamento III

Após o fracionamento da FHex (1,0 g) obteve-se 36 sub frações, que foram submetidas a CCD tendo como fase móvel hexano/acetato de etila 7:3 (v/v) e hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) sendo reveladas com iodo ou anisaldeído sulfúrico, após este procedimento algumas sub frações foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico. Dando origem as sub frações denominadas F1, F2A, F2B, F2C, F3A, F3B, F3C, F4A, F4B, F4C, F5 e F6. O rendimento deste fracionamento esta demonstrado na tabela 10. Os cromatogramas são apresentados nas figuras 14 e 15. Na tabela 11 estão demonstrados os valores de  $R_f$  referente a figura 14.

Tabela 10: Frações e rendimento do fracionamento da fração FHex

Fração	(g)	Rendimento (%)
F1	ND	ND
F2A	0,055	5,5
F2B	0,090	9,0
F2C	0,150	15
F3A	0,102	10,2
F3B	0,042	4,2
F3C	0,032	3,2
F4A	0,033	3,3
F4B	0,038	3,8
F4C	0,040	4,0
F5	0,125	12,5
F6	0,142	14,2

ND: Valor não detectável

Devido ao padrão cromatográfico observado na CCD da figura 14, as frações F1, F2A e F2B1, F2B2 e F2B3 foram agrupadas dando origem a fração F2. As frações 2C1, 2C2, 2C3 e 2C4 também foram agrupadas originando a fração F2C.



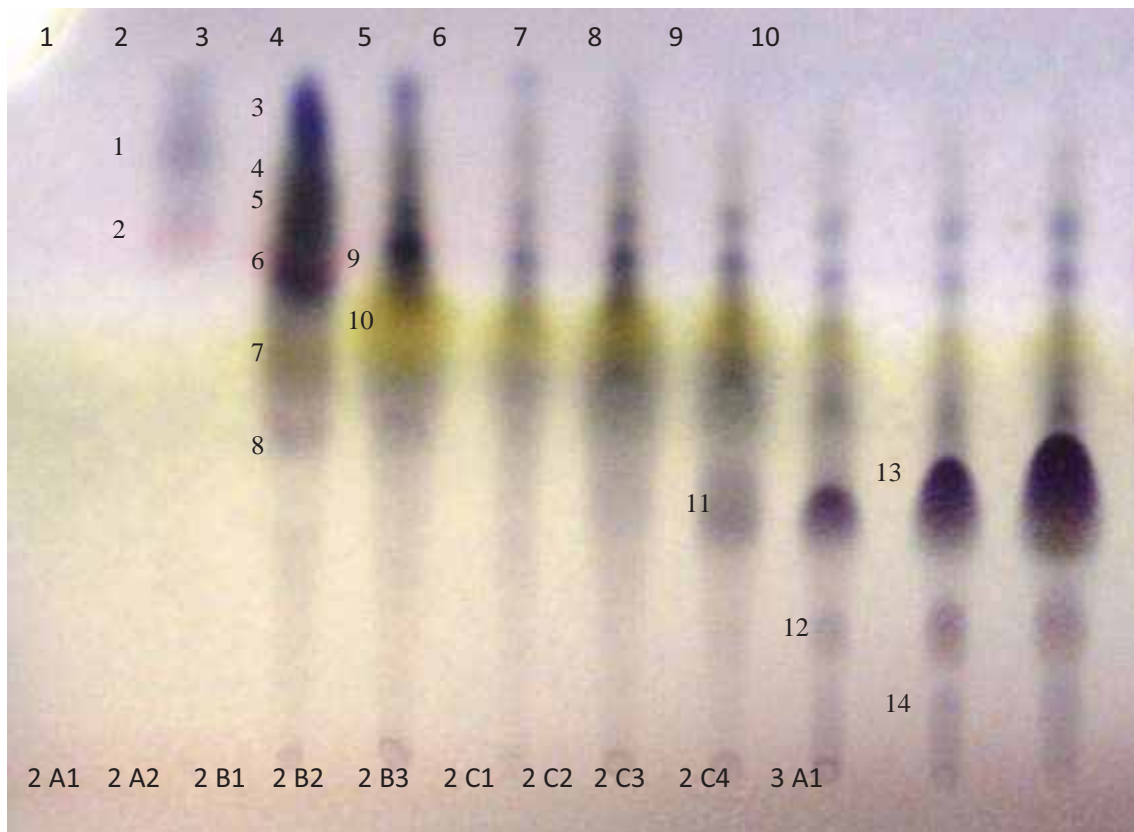


Figura 14: Cromatograma do fracionamento de FHex, fase móvel Hexano/Acetato de etila 8:2, revelador anisaldeído sulfúrico.

Tabela11: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 14

Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$
1	0,82	5	0,70	9	0,68	13	0,38
2	0,72	6	0,65	10	0,56	14	0,09
3	0,86	7	0,51	11	0,35		
4	0,77	8	0,45	12	0,19		

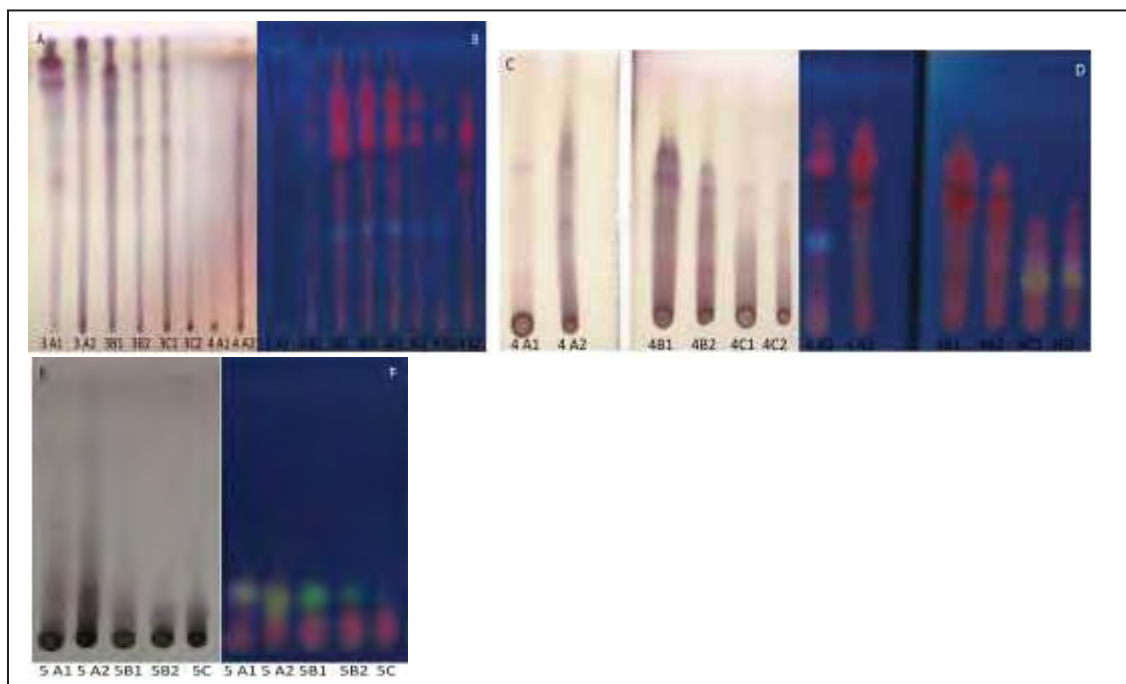


Figura 15: CCD das frações de FHex. A, C e E reveladas com anisaldeído sulfúrico, B, D e F frente a luz UV. Fase móvel Hexano/Aceta Etila 6:4 (v/v)

#### 5.3.1.4. Fracionamento do Extrato EtOH 70 – Fracionamento IV

A partir da massa inicial de 35 g do extrato EtOH 70 obteve-se as frações: fração hexano (FHex), fração acetato de etila (FAC), fração clorofórmio (FClor) e fração residual aquosa (FAquosa), o rendimento está demonstrado na tabela 11.

Tabela 12: Frações e rendimento do fracionamento IV

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
FHex	25,27	72,2
FAC	0,38	1,08
FClor	2,82	8,05
FAquosa	ND	ND

ND: Valor não determinado

### 5.3.1.5. Fracionamento da fração Intermediária do fracionamento I (F. Int) por cromatografia em coluna- Fracionamento V

Para o fracionamento V, utilizou-se 1,625 g da FInt. Após o fracionamento obteve-se 32 sub frações. Conforme demonstrado na figura 16

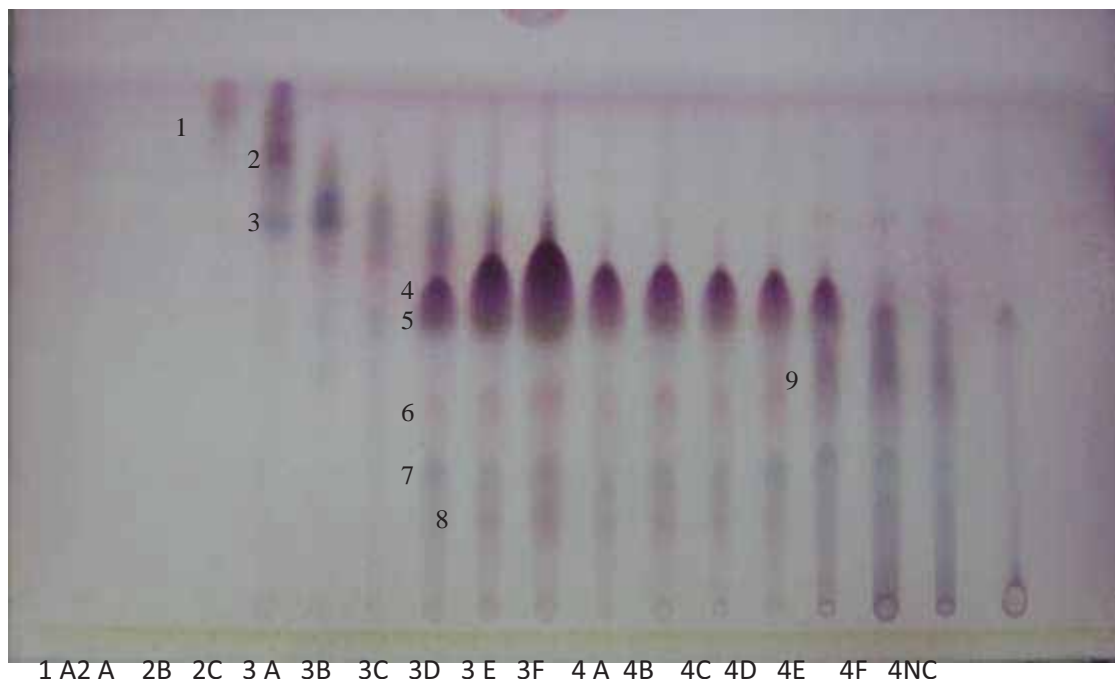


Figura 16: Frações do fracionamento V, Fase móvel Hexano/Acetato de Etila 7:3 (v/v) revelador anisaldeído sulfúrico.

Na tabela 13 estão relacionados os valores de  $R_f$  relativos a figura 16.

Tabela 13: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 16

Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$
1	0,94	6	0,39
2	0,89	7	0,26
3	0,76	8	0,18
4	0,63	9	0,44
5	0,56		

A figura 17 (A e B) apresenta um cromatograma com fase móvel Hexano/Acetato de etila 9:1 (v/v) e revelador anisaldeído. Na figura 17A a placa de CCD após revelação com anisaldeído, na figura 17B a mesma placa

observada sob luz UV. Observamos amostras com diferentes perfis cromatográficos e que apresentam ação antifúngica.

Observa-se uma mancha em F01 com R<sub>f</sub> de 0,87 compatível com o padrão de óxido de cariofileno (coluna 5 e 10). Pelos resultados observa-se semelhança entre a amostra Flnt e FHex, porém estas apresentam-se diferentes da amostra FRes. Podemos observar diferenças no padrão de manchas nas amostras F01, F3B, F3C e F4A.

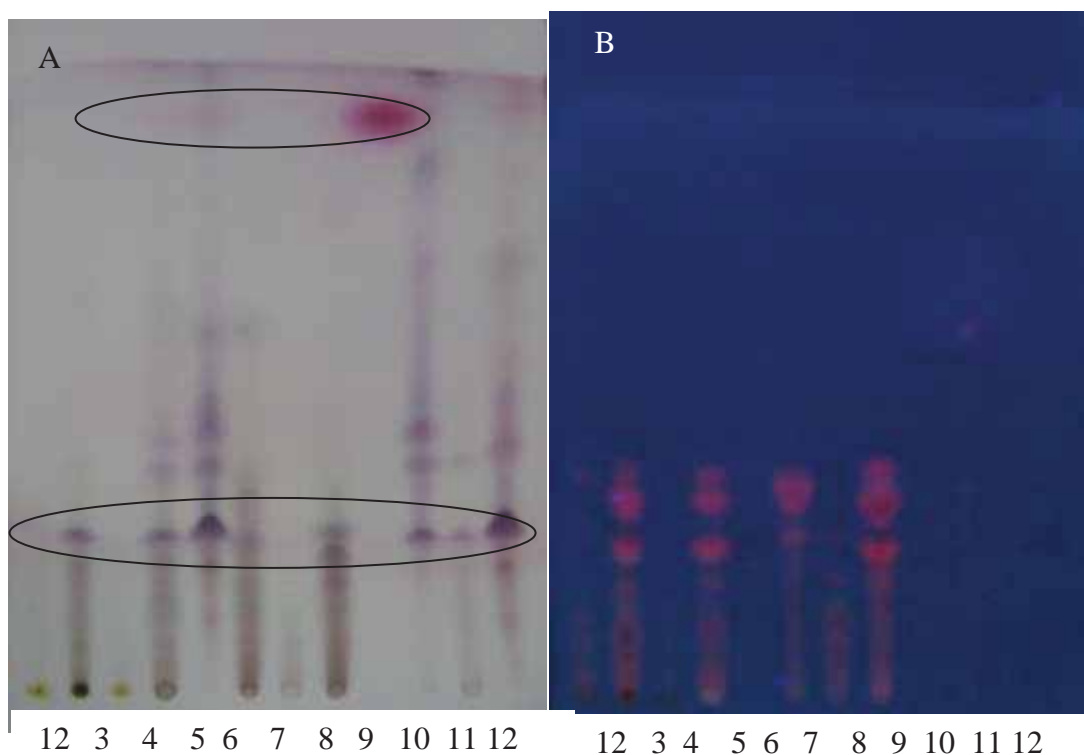


Figura 17: CCD frações de *P. umbellata*. Fig 17 A: Ordem de aplicação 1- EtOH, 2- Flnt, 3- FRes, 4 - FHex, 5-F01, 6-F3B, 7-F3C, 8-F4A, 9-Ox. de Cariofileno, 10- 4NC (fração), 11- 4NC, 12-F01. Fig.17B: mesma ordem de aplicação observada em luz UV

Na figura 18 está apresentada a CCD das frações F2 e F2C. Observa-se a presença de mancha arroxeada com mesmo R<sub>f</sub> do padrão de 4-NC.

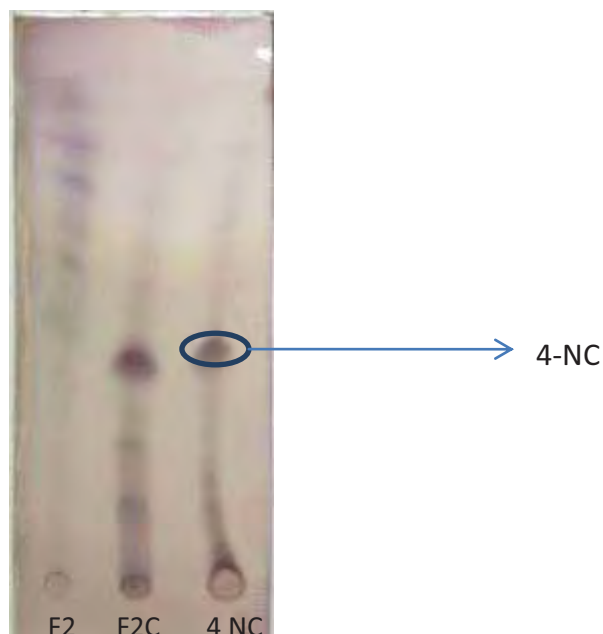


Figura 18: CCD fração F2 e F2C. Fração F2, F2C e 4-NC (padrão), Fase móvel Hexano/Acetato de etila 8:2, revelador Anisaldeído.

A figura 19 demonstra a presença de 4-NC em frações obtidas do fracionamento V. Observa-se mancha com cor e Rf 0,56 compatível ao padrão de 4-NC, demonstrando a provável presença deste em algumas frações.

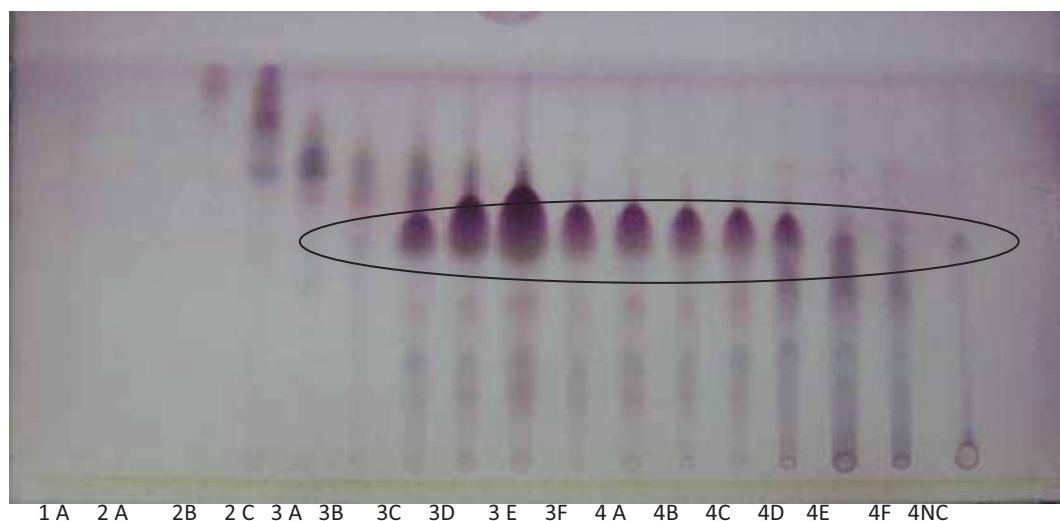


Figura 19: Frações do fracionamento V, Fase móvel Hexano/Acetato de Etila 7:3 (v/v), revelador anisaldeído.

As frações mais ricas em 4-NC foram submetidas a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa para obtenção de quantidade suficiente a ser enviada para caracterização por técnica espectroscópica.

Observa-se na figura 20 (A e B) e 21 (A e B) cromatogramas das frações de *P. umbellata*, demonstrando diferenças no padrão cromatográfico.

De acordo com Wagner et al. (1984), após a revelação de placas cromatográficas em camada delgada (CCD), flavonóides em presença de luz UV 365 nm podem aparecer em amarelo fluorescente, azul ou verde; saponinas quando reveladas por anisaldeído podem apresentar coloração azul, azul violeta e as vezes amarelado; cumarinas podem apresentar cor azul ou azul esverdeado fluorescente em presença de luz UV 365 nm e furanocumarinas podem apresentar cor amarelo, marrom ou azul fluorescente; alcalóides em presença de luz UV 365 nm, podem se apresentar azul fluorescente ou amarelo; já os derivados da antraquinona, podem apresentar cor amarelo ou vermelho-amarronzado fluorescente em presença de luz UV 365 nm; o óleo essencial em presença de luz UV 365 nm pode apresentar cor azul fluorescente intenso e quando revelado por anisaldeído sulfúrico apresenta cor intensa azul, verde, vermelho e marrom.

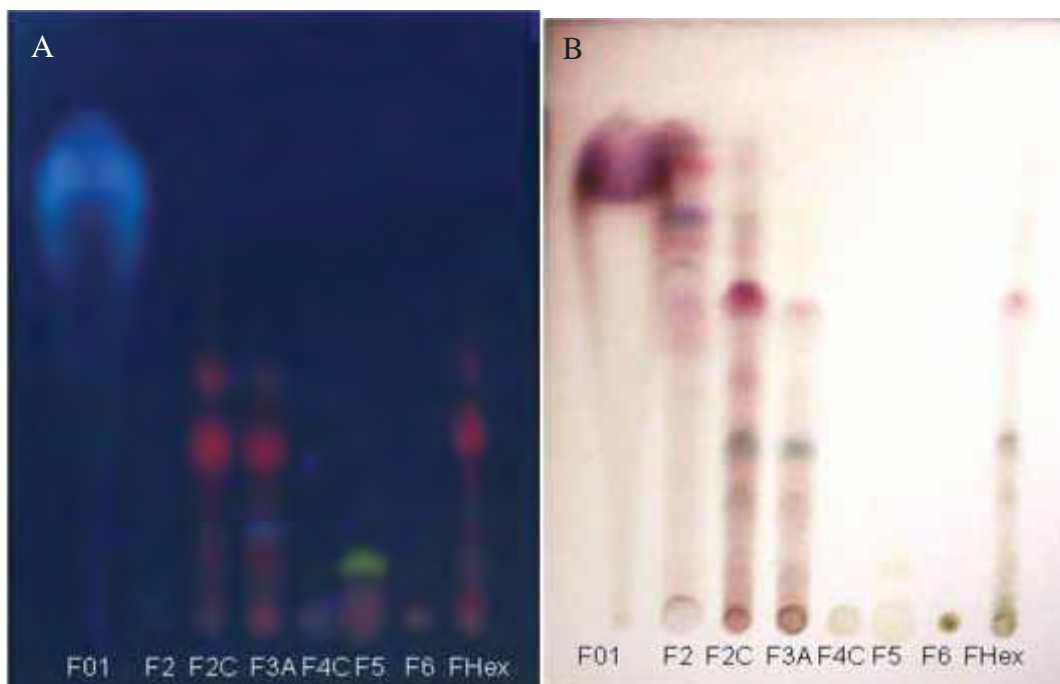


Figura 20: Cromatografia das frações de *P. umbellata* II, F01, F2, F2C, F3A, F4C, F5, F6 e FHex. Fase móvel Hexano/Acetato de etila (7:3). Fig20 A: Placa analisada sob luz UV 365 nm. Fig 20 B: Revelada com anisaldeído sulfúrico.

Observa-se na figura 20 a presença de manchas azuis em F01 e F3A, mancha amarela fluorescente em F5 podendo se tratar de flavonoides.

Observa-se na figura 21 a presença de manchas azuis em, FHex, Fint e FClor. Na tabela 14 esta demonstrado o  $R_f$  das manchas.

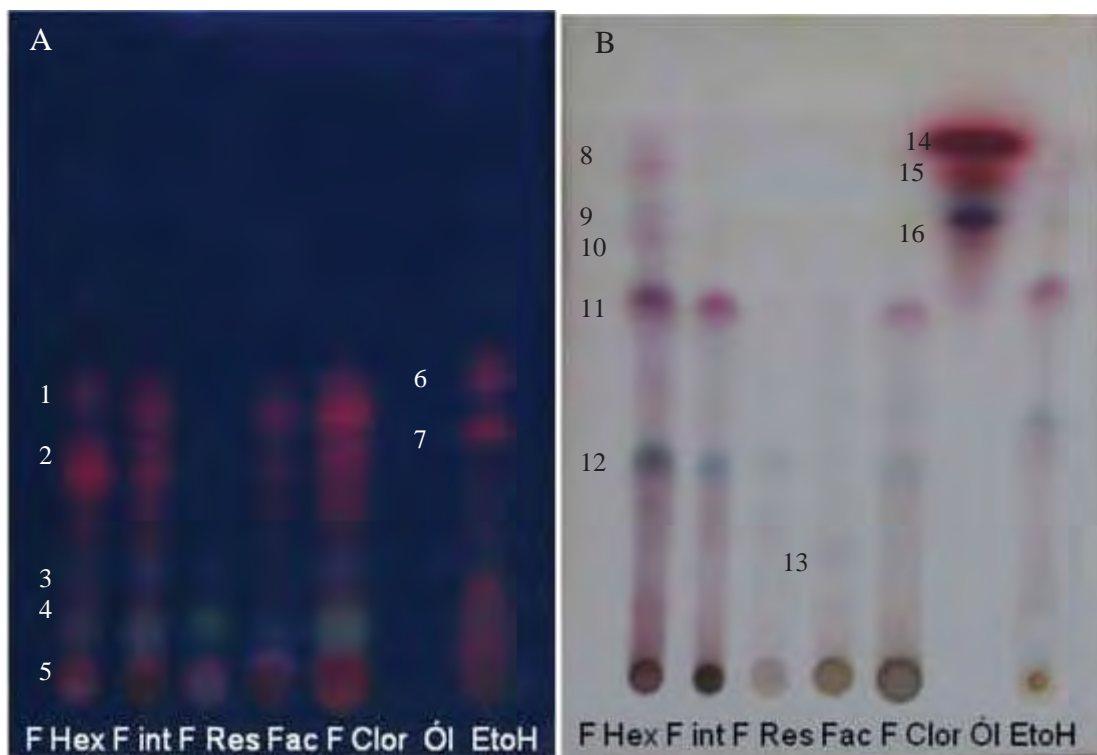


Figura 21: Cromatografia frações de *P. umbellata* III, fase móvel Acetato de Etila/Etanol (6:4). FHex, FInt, FRes, FAc, FClor, óleo essencial, extrato EtOH 70. Fig 21 A: Placa analisada sob luz UV 365 nm. Fig 21 B: Revelada com anisaldeído sulfúrico.

Tabela 14: Fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas do cromatograma da figura 21

Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$	Mancha	$R_f$
1	0,53	5	0,04	9	0,85	13	0,22
2	0,40	6	0,56	10	0,80	14	0,96
3	0,18	7	0,47	11	0,68	15	0,88
4	0,10	8	0,92	12	0,40	16	0,80

Na figura 22, analisando as frações F01 e F2, observa-se mancha púrpura com  $R_f$  0,81 compatível com óxido de cariofileno.

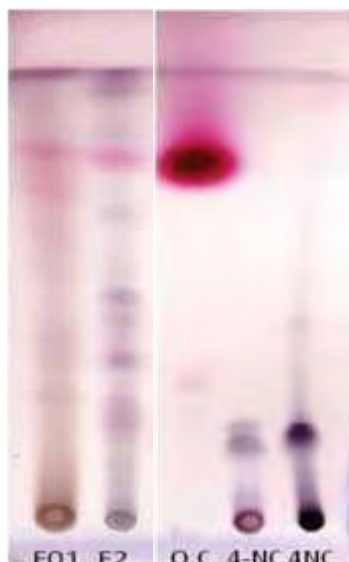


Figura 22: Cromatograma das frações F01 e F2 de *P. umbellata*, Oxido de cariofileno (O.C) e padrões de 4-NC. Fase móvel Hexano/Acetato de etila (9:1), revelador anisaldeído sulfúrico.

### 5.3.2. Obtenção do extrato aquoso

A partir de 50 g da planta seca obteve-se após liofilização 1,75 g, com um rendimento de 3,5%.

### 5.3.3. Obtenção do extrato hexânico

A partir de 50 g da planta seca obteve-se 2,28 g de extrato hexânico seco, com um rendimento de 4,56%.

### 5.3.4. Obtenção do extrato hexano/acetato de etila

A partir de 50 g da planta seca obteve-se 4,31 g de extrato hexano/acetato de etila seco, com um rendimento de 8,62%.

Tabela 14: Rendimento dos extratos de *P. umbellata* a partir de 50 g da planta seca.

Extrato	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
Aquoso	1,75	3,5
Hexânico	2,28	4,56
Hexano/Acetato de etila	4,31	8,62



## 5.6. Obtenção do Óleo essencial

A partir de 300 g da planta seca e moída, obteve-se um volume de 0,850 mL de óleo essencial correspondente a 0,610 g, apresentando um rendimento de 0,203%.

### 5.6.1. Determinação da densidade do óleo essencial

A densidade do óleo essencial foi determinada a partir da massa (g) em relação ao volume (mL), obtendo-se o resultado de 0,717 g/mL.

## 5.7. Análise dos constituintes de *P. umbellata* por CG-EM

### 5.7.1. Análise do óleo essencial

O óleo essencial foi submetido a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), obtendo-se o cromatograma observado na figura 23.

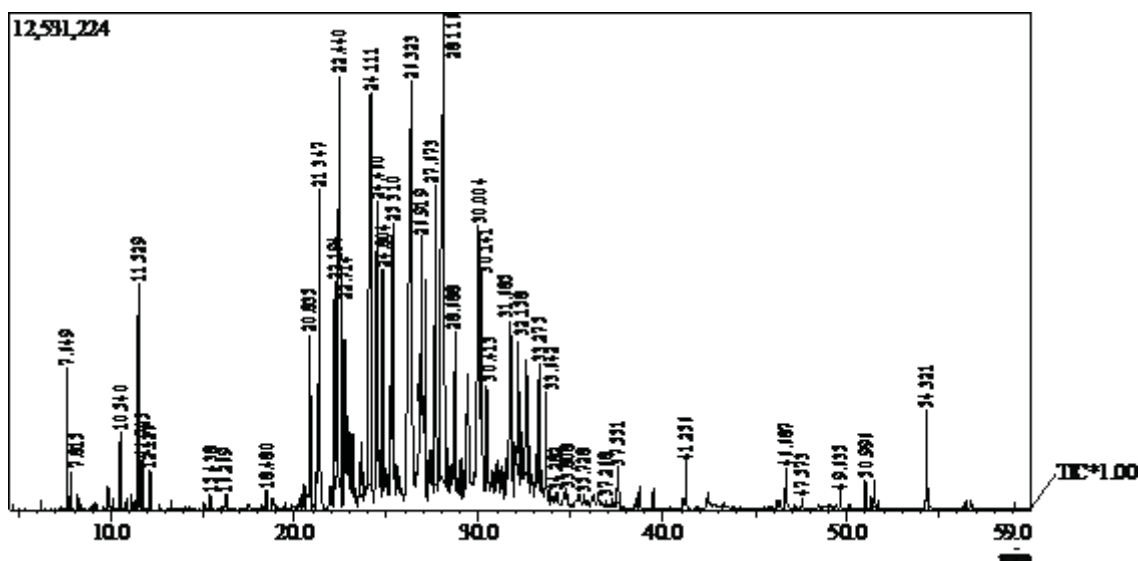


Figura 23: Cromatograma CG-EM do óleo essencial de *P. umbellata*, condição de análise: coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25  $\mu$ m de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano, gás de arraste hélio (99,999%), fluxo de 1,0 mL/min. Temperatura do injetor 240  $^{\circ}$ C, volume de injeção 0,1  $\mu$ L. Temperatura do forno 60 $^{\circ}$ C a 240 $^{\circ}$ C a uma velocidade de 3 $^{\circ}$ C/min.

A partir da análise, os espectros de massas e os picos majoritários, obtidos foram comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007) e com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS),

expresso em porcentagem. A identificação de cada constituinte químico presente no óleo essencial foi feita com base na combinação entre os valores do Índice de Kovats (IR) e de IS. Os resultados estão demonstrados na tabela 15.

Tabela 15: Substâncias identificadas no óleo essencial de *P. umbellata*.

Tempo retenção	Índice de Kovats (IR)	IS %- Biblioteca	Substância	%
11.529	1103	96 - NIST 08	Linalol	2,35
11.725	1343		Elemeno	1,74
12.126	1356	96- NIST 08	Alfa-cubebeno	3,9
22.194	1378	90- FFNSC 1.2	Beta-patchouleno	3,11
22.440	1383	96- NIST 08	Copaeno	7,36
22.714	1356		Beta-bourbuneno	0,80
22.897	1393	93-WILEY7.LIB	Germacreno D	0,44
23.656	1390		Alfa-gourjuneno	0,65
24.111	1428	94- NIST 08	$\beta$ -Cariofileno	8,07
25.310	1460		Geranil acetona	2,53
26.323	1486	97- FFNSC 1.2	Cadieno	6,09
27.116	1493		Alfa-muuroleno	2,03
27.673	1497		Muurolo	5,57
28.116	1501		Gama-cadieno	13,40
29.405	1571	92- NIST 08	Nerolidol	1,26
30.004	1587	94- NIST 08	Espatuleno	3,57
30.141	1591	92- FFNSC	Ox. Cariofileno	1,87
31.956	1636		Cariofileno	1,82
32.298	1640		Alfa-muurolo	1,42

IS %: Índice de similaridade em porcentagem

A substância majoritária encontrada no óleo essencial de *P. umbellata* foi o gama cadieno, seguido de  $\beta$ -cariofileno, copaeno e cadieno.

### 5.7.2. Análise da fração F2

A fração F2 foi submetida a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), obtendo-se o cromatograma observado na figura 24. Os resultados estão demonstrados na tabela 16.

A partir da análise, os espectros de massas e os picos majoritários, obtidos foram comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007) e com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem. A identificação dos constituintes químicos presente na fração F2 foi feita com base na combinação entre os valores do índice de Kovats (IR) e de IS.

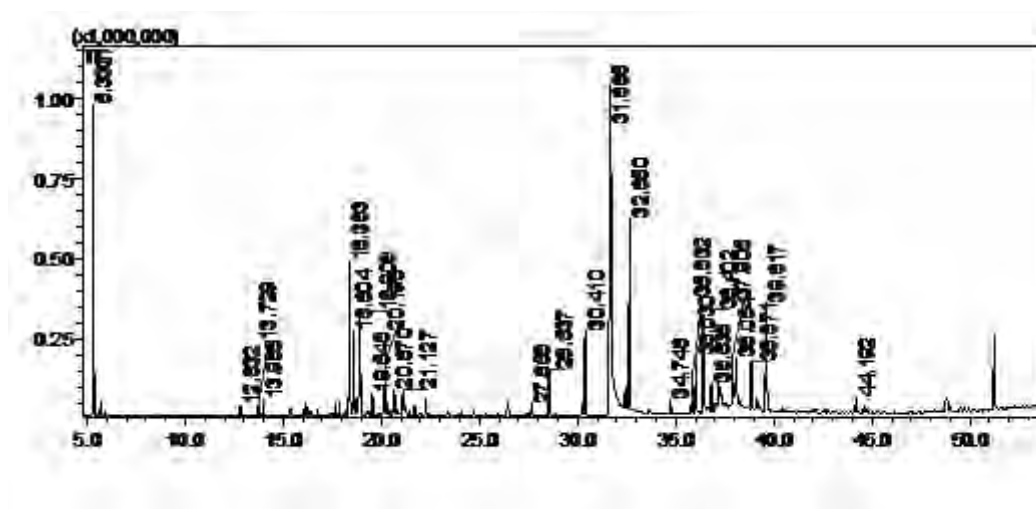


Figura 24: Cromatograma CG-EM da fração F2 de *P. umbellata*, condição de análise: coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25  $\mu$ m de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano, gás de arraste hélio (99,999%), fluxo de 1,0 mL/min. Temperatura do injetor 240 °C, volume de injeção 0,1  $\mu$ L. Temperatura do forno 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C/min.

Tabela 16: Substâncias identificadas na fração F2 de *P. umbellata*.

Tempo Retenção	IS %- Biblioteca	Substância	%
5.330	98% FFNSC 1.2.LIB	Canfora	9,06
13.729	88% NIST08 LIB	Neril acetona	0,4
18.383	92% FFNSC 1.2.LIB	Espatuleno	7,16
18.604	92% FFNSC 1.2.LIB	Oxido de Cariofileno	3,81
18.908	93% FFNSC 1.2.LIB	Viridiflorol	3,56
20.196	87% NIST08 LIB	Espatuleno	2,41
28.537	96% WILEY7.LIB	Isobutil o-fitalato	2,15
30.410	96% NIST08 LIB	Acido hexadecanóico	3,36
35.832	90% WILEY7.LIB	Acido octadecanóico	1,55
36.402	94% FFNSC 1.2.LIB	Fitol	4,85
36.835		Ácido linoleico	1,21
44.192	92% NIST08.LIB	Ác.Octadecanóico	0,6

### 5.7.3. Análise da fração F2C

A fração F2C foi submetida a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), obtendo-se o cromatograma observado na figura 25. Os resultados estão demonstrados na tabela 17.

A partir da análise, os espectros de massas e os picos majoritários, obtidos foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem.

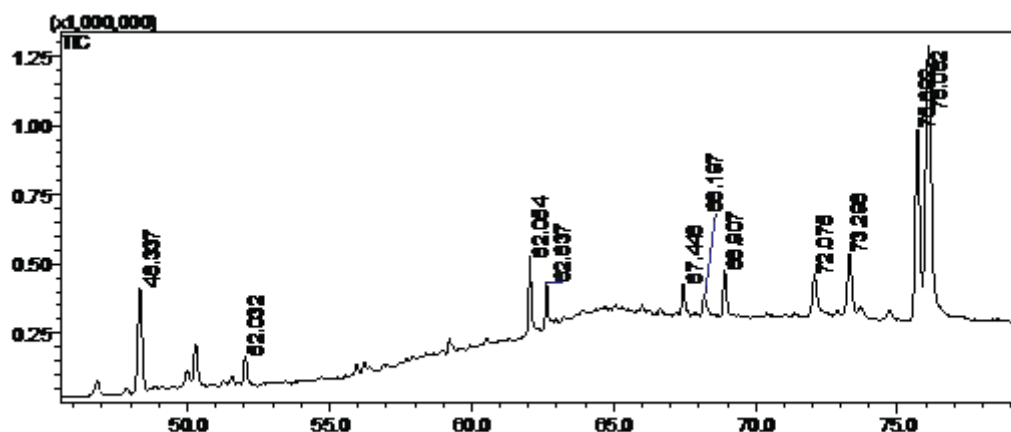


Figura 25: Cromatograma CG-EM da fração F2C de *P. umbellata*, condição de análise: coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25  $\mu$ m de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano, gás de arraste hélio (99,999%), fluxo de 1,0 mL/min. Temperatura do injetor 240  $^{\circ}$ C, volume de injeção 0,1  $\mu$ L. Temperatura do forno 60 $^{\circ}$ C a 240 $^{\circ}$ C a uma velocidade de 3 $^{\circ}$ C/min.

Tabela 17: Substâncias identificadas na fração F2C de *P. umbellata*.

Tempo Retenção	IS %- Biblioteca	Substância	%
48.337	91% NIST08.LIB	Esqualeno	13,92
52.032	92% NIST08.LIB	Tetrapentacontano	2,08

### 5.8. Identificação do 4-Nerolidilcatecol

O espectro de APCI (figura 26), *full scan*, modo negativo, da substância 1 isolada da fração (F2) hexânica do extrato etanólico bruto de *P. umbellata* evidenciou o íon da molécula desprotonada em  $m/z$  313  $[M - H]^-$  e fragmentos representativos referentes a perdas de metilas em  $m/z$  283  $[M - (2 \times 15) - H]^-$ . Em  $m/z$  235 observa-se a perda de metilas e água  $[M - (4 \times 15) - 18 - H]^-$  e finalmente em  $m/z$  175 e 162 referentes aos fragmentos representadas na figura 27:

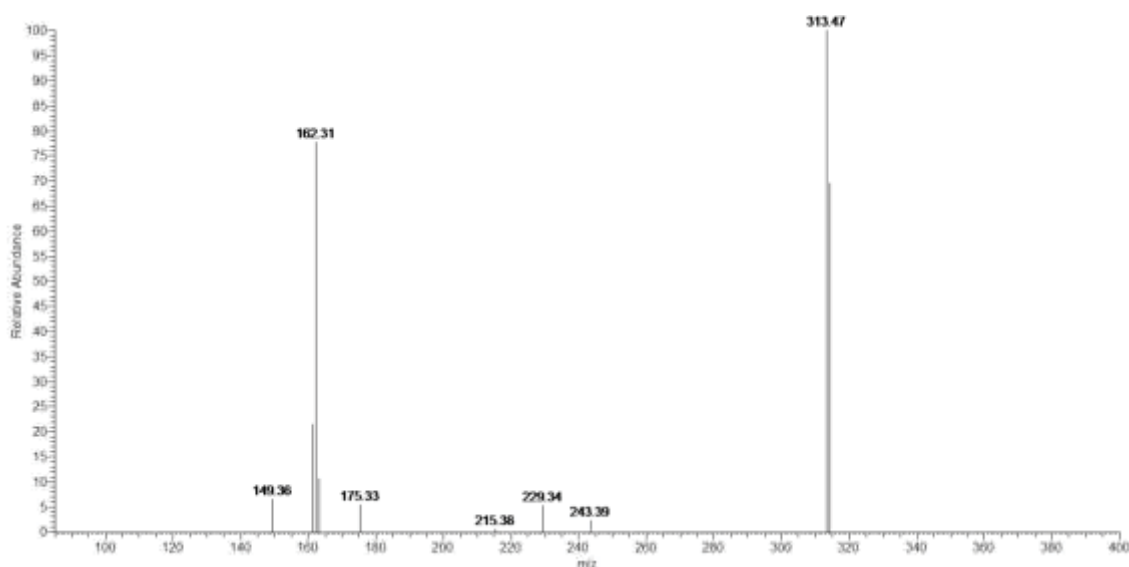


Figura 26: Espectro APCI modo negativo do 4-Nerodilcatecol

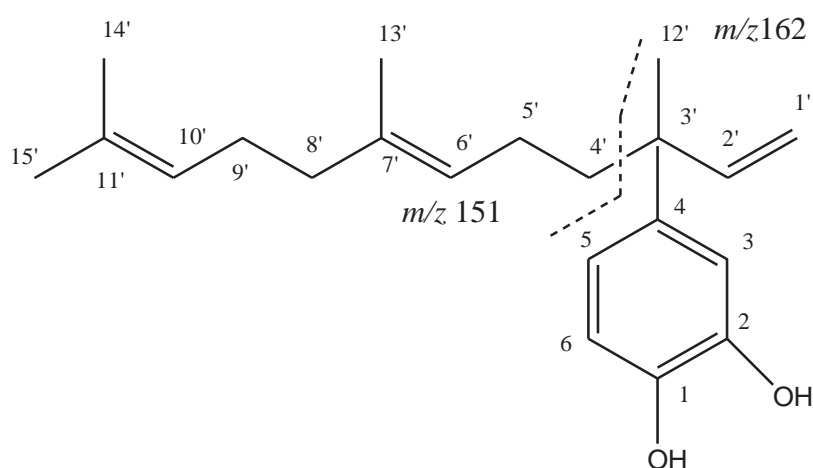


Figura 27: Estrutura do 4 NC e padrão de ruptura

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 28) da substância 1 isolada da fração hexânica do extrato etanólico bruto de *P.umbelatta* apresentou hidrogênios na região alifática evidenciando a presença de quatro grupos metilas ( $\delta$  1,62; 1,54; 1,46 e 1,26, 3 H, s, cada).

Observou-se ainda o deslocamento químico de dois simpletos de hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,03 (2H) e de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  1,94 (6H) e  $\delta$  1,74 (2H). Aliados a informação de hidrogênios apresentando acoplamentos em *trans* e geminal  $\delta$  5,99 (1 H, *dd*,  $J = 17,0$  e 1,3 Hz) e em *cis/trans*  $\delta$  5,97 (1 H, *d*,  $J = 11,0$  e 17,0 Hz respectivamente). Outro

deslocamento químico referente a hidrogênio vinílico geminal foi observado em  $\delta$  6,7 (1 H, dd,  $J = 10$  e 1,0 Hz) evidenciando hidrogênios vinílicos geminais. Os hidrogênios do anel aromático foram observados em  $\delta$  6,76 a 6,86. Os hidrogênios em 6,80 (1H, d,  $J = 2,0$ ) foram caracterizados como acoplados em *meta*. O hidrogênio com deslocamento químico em 6,76 (1H, dd,  $J = 8,0$ ; 2,0) evidenciou a existência de hidrogênios acoplados *orto/meta*. Finalmente o deslocamento químico do hidrogênio em 6,77 (1H, d,  $J = 8,0$  H) confirmou o sistema de acoplamento em *orto* de um anel aromático trissubstituído com um sistema catecol.

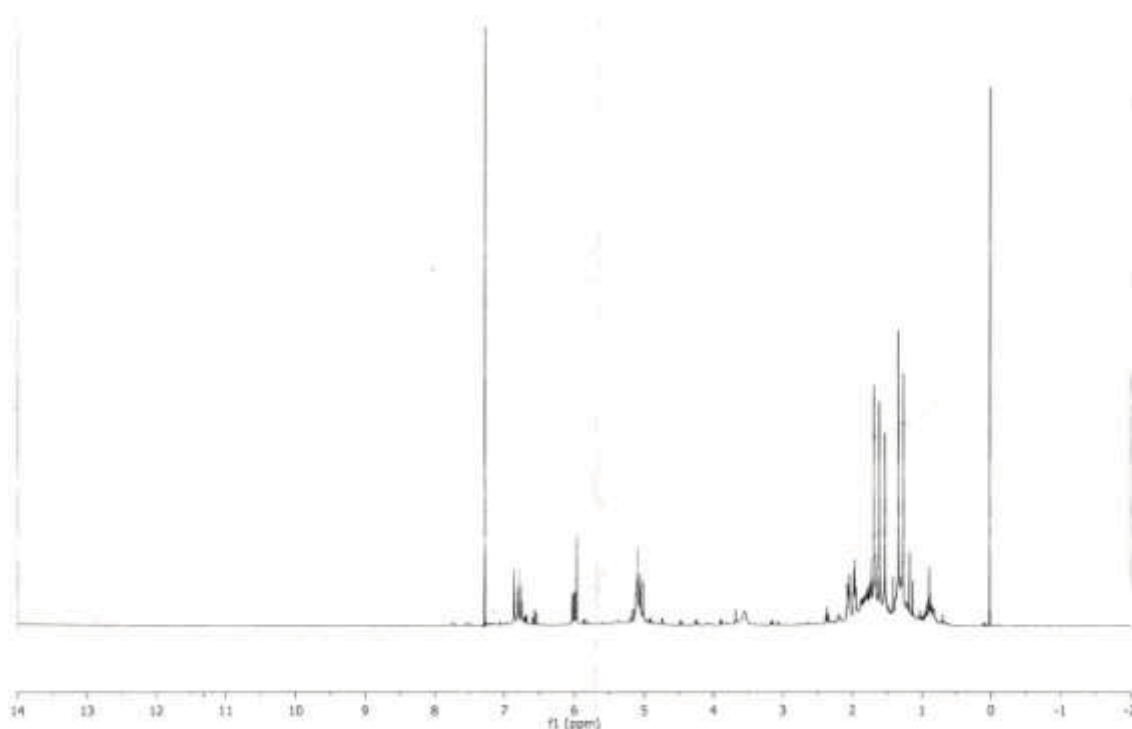


Figura 28: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 4-Nerolidilcatecol

Portanto diante das evidências apresentadas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação com dados da literatura (BALDOQUI, et al., 2009), podemos concluir que esta substância é a 4-nerolidilcatecol (Figura 29, Tabela 18)

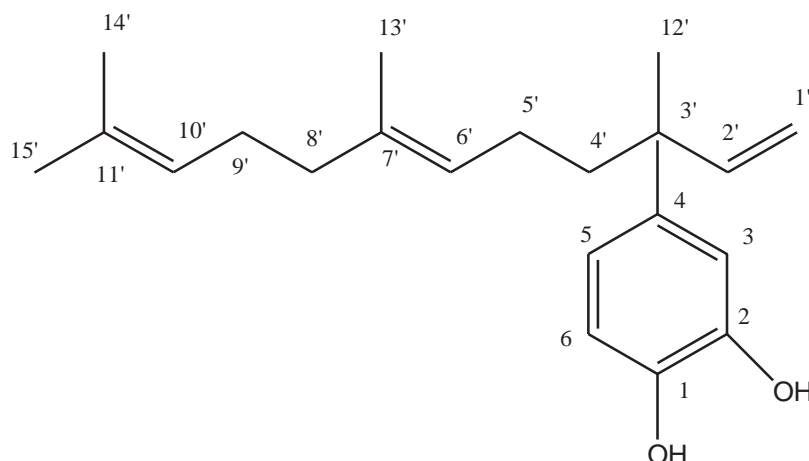


Figura 29 – Estrutura da 4-nerodilcatecol (Substância 1)

Tabela 18 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da 4-nerolidilcatecol – (Substância 1), ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 500 MHz)

Posição	Substância 1	Literatura (Baldoque et al., 2009)
	RMN $^1\text{H}$ ( $J = \text{Hz}$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $J = \text{Hz}$ )
1		-
2		-
3	6,80 <i>d</i> (2,0)	6,79 <i>d</i> (2,0)
4		-
5	6,76 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	6,72 <i>dd</i> (8,0; 2,0)
6	6,77 <i>d</i> (8,0)	6,77 <i>d</i> (8,0)
1'	5,93 <i>dd</i> (10,0; 17,0)	5,06 <i>m</i>
2'	5,99 <i>dd</i> (17,0; 1,3)	5,93 <i>dd</i> (17,0; 1,3)
3'		-
4'	1,94 <i>m</i>	1,94 <i>m</i>
5'	1,74 <i>m</i>	1,74 <i>m</i>
6'	5,03 <i>m</i>	5,03 <i>m</i>
7'		-
8'	1,94 <i>m</i>	1,94 <i>m</i>
9'	1,94 <i>m</i>	1,94 <i>m</i>
10'	5,03 <i>m</i>	5,03 <i>m</i>
11'		
12'	1,26 <i>s</i>	1,26 <i>s</i>
13'	1,62 <i>s</i>	1,62 <i>s</i>
14'	1,46 <i>s</i>	1,46 <i>s</i>
15'	1,54 <i>s</i>	1,54 <i>s</i>

### 5.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da CIM estão demonstrados nas tabelas 19, 20, 21 e 22.



Tabela 19: Concentração Inibitória Mínima(CIM) para os extratos e óleo essencial de *P. umbellata* frente as linhagens fúngicas

Extrato/Linhagem	Tr1 (µg/mL)	Tr FOC (µg/mL)	Tm (µg/mL)	Mc(µg/mL)
EtOH 70	39,06	312,5	312,5	39,06
EtOH 50	39,06	312,5	312,5	39,06
Ext. Aquoso	12500,00	ND	6250,00	6250,00
Ext. Hex	39,06	312,5	312,5	39,06
Ext. Hex/Ac	39,06	312,5	312,5	39,06
Óleo	223	896	1.792,00	448
Anfo B	0,25	0,25	0,25	0,25
Voriconazol	0,125	0,25	1,0	4,0
Fluconazol	0,5	ND	ND	4,0

ND= Não Determinado, EtOH 70= Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*, EtOH 50= Extrato etanólico 50° GL de *P. umbellata*, Ext. Aquoso= Extrato aquoso de *P. umbellata* liofilizado, Ext. Aquoso inf= Extrato aquoso de *P. umbellata*, Ext. Hex= Extrato hexânico de *P. umbellata*, Ext. Hex/Ac=Extrato hexano/acetato de etila (1:1) de *P. umbellata*, Óleo= óleo essencial de *P. umbellata*, Anfo B= Anfotericina B.

O extrato EtOH 70 (tabela 19) apresentou boa ação frente as linhagens testadas, assim como o extrato hexânico (Ext. Hex) e o extrato hexano/acetato de etila (Ext. Hex/Ac), o extrato aquoso apresentou ação em uma concentração elevada para Tr1 (12.500,00 µg/mL) e Mc (6250,00 µg/mL). O óleo essencial apresentou boa atividade, destacando melhor ação frente a linhagem Tr1, com CIM de 223 µg/mL, os valores de CIM frente as linhagens TrFOC, Mc e Tm foram superiores, demonstrando ação do óleo contra todas as linhagens testadas.

Na tabela 20 pode ser observado os valores de CIM para as frações do extrato EtOH 70 *P. umbellata*. Várias frações deste extrato apresentam ação antifúngica. A fração hexano (FHex) apresentou a melhor atividade frente as linhagens Tr1, Tr FOC e Tm, com CIM de 9,76 µg/mL. Frente a linhagem Mc a melhor ação antifúngica foi da fração Hexano/ Acetato de Etila (F. Hex/Ac) (CIM de 4,88 µg/mL) seguida da fração Hexano (CIM de 9,76 µg/mL). A fração Residual (FRes) apresentou boa ação antifúngica para todas as linhagens, enquanto a fração Intermediária (F Int) apresentou CIMs com valores diferentes para as linhagens avaliadas. A fração F Ac apresentou melhor ação frente a linhagem Tr1 e a FClor apresentou melhor ação frente a Mc.

Tabela 20: Concentração Inibitória Mínima(CIM) para frações do extrato etanólico 70° GL (EtOH 70) de *P. umbellata* frente as linhagens fúngicas

Extrato/Linhagem	Tr1(µg/mL)	Tr FOC(µg/mL )	Tm (µg/mL)	Mc(µg/mL)
EtOH 70	39,06	312,5	312,5	39,06
F Hex <sup>(1)</sup>	9,76	9,76	9,76	9,76
F. Res <sup>(1)</sup>	78,12	78,12	78,12	78,12
F Int <sup>(1)</sup>	78,12	156,25	39,09	78,12
F Hex/Ac <sup>(2)</sup>	19,53	19,53	39,06	4,88
F Ac. Etila <sup>(2)</sup>	78,12	39,06	39,06	39,06
F Ac <sup>(3)</sup>	39,06	ND	312,5	78,12
FClor <sup>(3)</sup>	39,06	ND	312,5	9,75
Anfo B	0,25	0,25	0,25	0,25
Voriconazol	0,125	0,25	1,0	4,0
Fluconazol	0,5	ND	ND	4,0

ND= Não Determinado, EtOH 70= Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*, F. Hex<sup>(1)</sup>= Fração hexano, FRes<sup>(1)</sup>= Fração residual, F int<sup>(1)</sup>= Fração intermediária <sup>(1)</sup> = frações obtidas por fracionamento líquido/líquido do Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata* (fracionamento I), F.Hex/Ac<sup>(2)</sup>= Fração hexano/acetato de etila, F. Ac. Etila<sup>(2)</sup>= Fração acetato de etila, <sup>(2)</sup>= Frações obtidas por fracionamento líquido/líquido do Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata* (fracionamento II), F Ac<sup>(3)</sup>= Fração Acetato de etila, F. Clor<sup>(3)</sup>= Fração clorofórmio, <sup>(3)</sup>= Frações obtidas por fracionamento líquido/líquido do Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*(fracionamento IV) Anfo B= Anfotericina B.

Na tabela 21 podemos observar os valores de CIM para subfrações da fração hexano.

As frações F3A e F2C apresentaram valores diferentes frente às linhagens fúngicas com baixos valores de CIM. A fração F4C apresentou CIM de valores intermediários para as linhagens fúngicas. A partir dos dados apresentados na tabela 16 observa-se que a maioria das frações apresentou ação antifúngica.

Tabela 21: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para sub frações da fração Hexano (FHex) do extrato etanólico 70° GL (EtOH 70) de *P. umbellata* frente as linhagens fúngicas

Extrato/Linhagem	Tr1 (µg/mL)	Tr FOC (µg/mL)	Tm (µg/mL)	Mc (µg/mL)
EtOH 70	39,06	312,5	312,5	39,06
F Hex	9,76	9,76	9,76	9,76
F01	312,5	625	78,12	ND
F2	78,12	78,12	1250	156,25
F2C	4,88	39,06	ND	9,76
F3A	9,76	39,06	78,12	19,53
F4C	312,5	312,5	156,25	156,25
F5	78,12	ND	625	312,5
F6	1250	ND	ND	ND
Anfo B	0,25	0,25	0,25	0,25
Voriconazol	0,125	0,25	1,0	4,0
Fluconazol	0,5	ND	ND	4,0

ND= Não Determinado, EtOH 70= Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*, F. Hex= Fração hexano do Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*, F01, F2, F2C, F3A, F4C, F5, F6 = sub fração da fração hexano (fracionamento III), Anfo B= Anfotericina B

Na tabela 22, observa-se a CIM da frações e substâncias isoladas.

Tabela 22: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para substâncias isoladas da fração Hexano (FHex) do extrato etanólico 70° GL (EtOH 70) de *P. umbellata* frente a linhagem Tr1.

Extrato/Linhagem	Tr1 (µg/mL)
EtOH 70	39,06
F Hex	9,76
Subs. 2	>1250
4-NC	31,25
Anfo B	0,25
Voriconazol	0,125

ND= Não Determinado, EtOH 70= Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*, F. Hex= Fração hexano do Extrato etanólico 70° GL de *P. umbellata*, Subs. 2= isolada de F. Hex por CCD Preparativa, 4-NC= 4 Nerolidilcatecol isolado Hex por CCD Preparativa, Anfo B= Anfotericina B

Quanto as substâncias purificadas o 4-NC apresentou boa ação frente a linhagem Tr1, enquanto a Subs. 2 não apresentou ação antifúngica.

## 5.10. Determinação da Toxicidade

### 5.10.1. Toxicidade “*in vitro*”

Foi analisado efeito de citotoxicidade pela análise da viabilidade celular de macrófagos (linhagem J774). Os resultados estão demonstrados na tabela 23 e figura 30.

Tabela 23: IC<sub>50</sub> do óleo essencial, extrato EtOH 70, frações e substâncias isoladas de *P. umbellata* frente a linhagem de macrófagos J774

Amostra	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Ext. EtOH	209,66
FHex	40,05
FClor	557,78
FAc	31,77
FRes	106,65
F2	288,14
F4A	36,28
F2C	< 15,625
Subs 2	197,91
4-NC	< 15,625
Óleo essencial*	0,014%

\* Resultado expresso em %

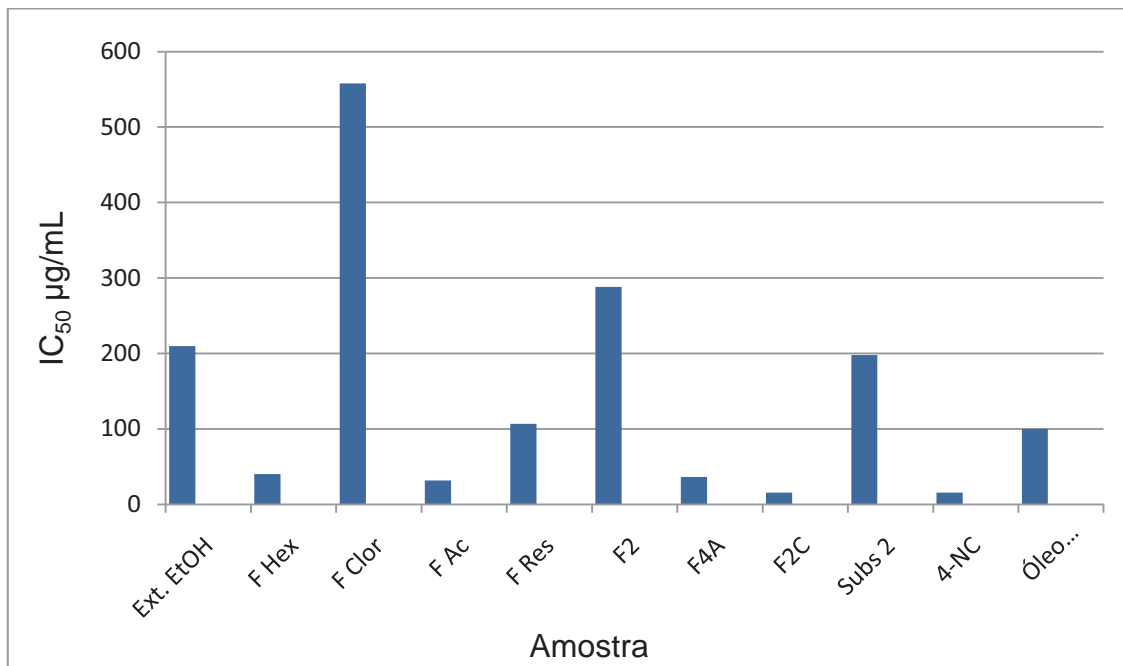


Figura 30: IC<sub>50</sub> do óleo essencial, extrato EtOH 70, frações e substâncias isoladas de *P. umbellata* frente a linhagem de macrófagos J774

O extrato etanólico 70 (EtOH 70) demonstrou baixa toxicidade. A fração Clorofórmio (F. Clor) e a fração F2 apresentaram citotoxicidade moderada. Do mesmo modo a fração FRes, e a substância 2 (Subs 2) apresentaram moderada toxicidade tóxicas. As frações Acetato de etila (FAC), F4A, e hexano (FHex) e o 4-NC demonstraram maior toxicidade para linhagem celular testada, assim como o óleo essencial.

Também foi avaliado o efeito de citotoxicidade pela análise da viabilidade celular frente a fibroblastos da córnea de coelho SIRC ATCC CCL60. Os resultados do índice de citotoxicidade de 50% (IC<sub>50</sub>), estão expressos na tabela 24.

Tabela 24: IC<sub>50</sub> do extratos EtOH 70 e fração FHex de *P. umbellata* frente a fibroblastos SIRC ATCC CCL60

Extrato/fração	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Ext. EtOH 70	1238,00
FHex	185,50

O extrato etanólico (EtOH 70) não mostrou citotoxicidade enquanto a FHex apresentou moderada citotoxicidade.

### 5.10.2- Toxicidade “*in vivo*”

Para o extrato EtOH 70, na dose de 2 g/Kg, não houve morte dos animais, assim como também não foram observados quaisquer outras alterações.

Entretanto, para a FHex do extrato EtOH 70, na dose de 2 g/Kg, observou-se morte de 3 animais, sendo 2 com menos de 24 horas e 1 após 24 horas. Observou-se também que os animais que morreram, apresentaram dificuldade respiratória e de movimentos, 30 minutos após a ingestão da fração FHex.

### 5.11. Dosagem do Ergosterol

A presença de ergosterol foi confirmada pela observação do espectro com 4 picos característicos quando analisado por espectrofotometria em 200-300 nm (figura 31).

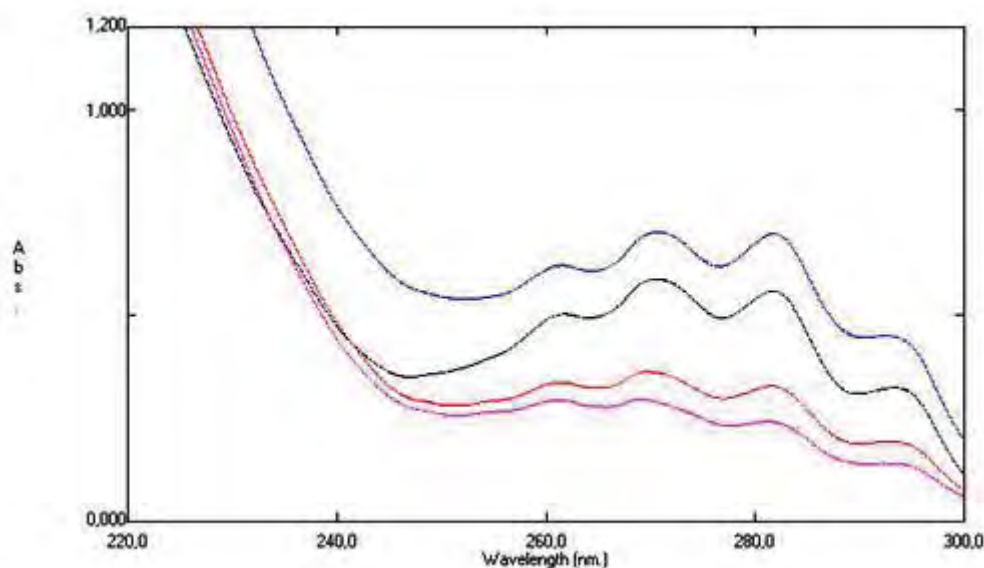


Figura 31: Espectro de ergosterol da linhagem Tr1 em diferentes condições de tratamento, em azul quando tratada com FHex, em preto controle (sem tratamento), em vermelho tratada com voriconazol e rosa tratada com fluconazol.

O resultado da dosagem do ergosterol está demonstrado na tabela 25.

Na linhagem Tr1 observou-se uma diminuição no ergosterol quando ocorreu incubação na presença da fração hexano (FHex), voriconazol e

fluconazol, em comparação com a condição controle. Ainda a incubação na presença de voriconazol apresentou menor porcentagem de ergosterol quando comparada a condição com hexano e na presença de fluconazol a porcentagem de ergosterol foi menor que em presença de voriconazol.

Frente a linhagem Mc observou-se uma diminuição no ergosterol quando ocorreu incubação na presença da fração hexano (FHex), voriconazol e fluconazol, em comparação com a condição controle. Quando comparada a incubação na presença de voriconazol, FHex e fluconazol, observou-se menor porcentagem de ergosterol na presença de voriconazol, e uma porcentagem igual entre fluconazol e FHex.

Tabela 25: Dosagem do ergosterol das linhagens *T. rubrum*(Tr1) e *M. canis* (Mc).

Linhagem	Condição experimental	Ergosterol (%)	Ergosterol (mg*)
Tr1	Controle 14 dias	0,020	0,2
Tr1	Hexano + 7 dias	0,018	0,18
Tr1	Voriconazol + 7 dias	0,013	0,13
Tr1	Fluconazol + 7 dias	0,007	0,07
Mc	Controle 14 dias	0,017	0,17
Mc	Hexano + 7 dias	0,015	0,15
Mc	Voriconazol + 7 dias	0,006	0,06
Mc	Fluconazol + 7 dias	0,015	0,15

mg\*: valor em relação a 1 g de massa fungica.

## 5.12. Avaliação das Proteínas Fúngicas

### 5.12.1. Determinação do perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida

A figura 32 mostra o resultado da eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da linhagem *M. canis* (Mc) em condição controle por 7 e 14 dias e com crescimento frente a fração FHex + 7 dias.

Para a linhagem Mc frente a F Hex do extrato etanólico 70° GL (coluna 3), observa-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 90 kDa e

de outra de aproximadamente 70,0 kDa, observa-se também o desaparecimento de banda de aproximadamente 31,0 kDa.

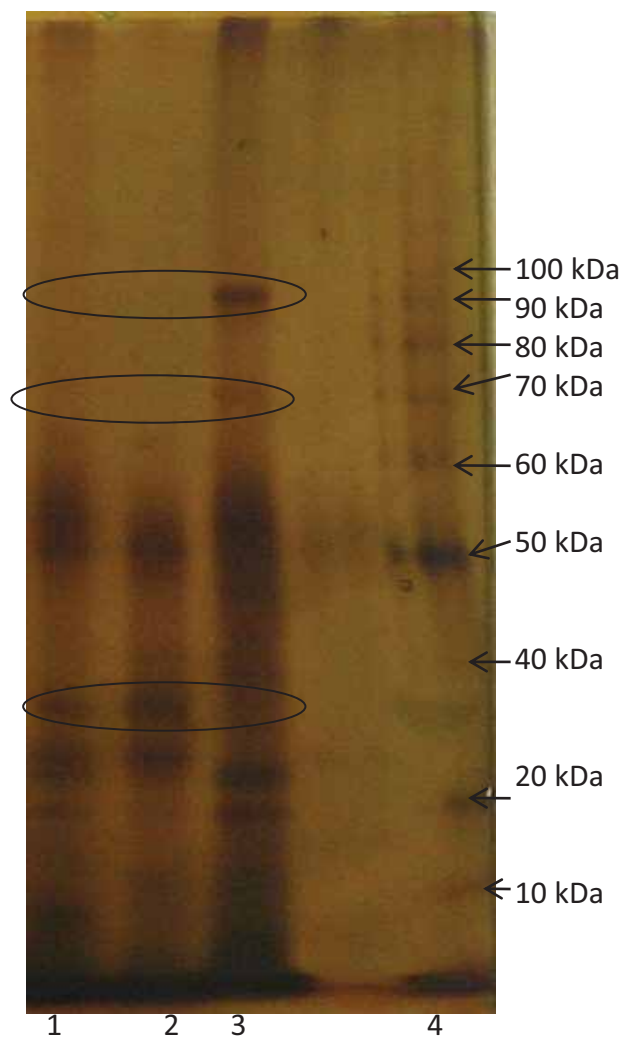


Figura 32: SDS-PAGE linhagem Mc, 1-Mc controle 7 dias, 2- Mc controle 14 dias, 3- Mc frente fração FHex + 7 dias, 4-Peso Molecular

Na figura 33, observa-se o gel de SDS-PAGE com o filtrado fúngico da linhagem Tr1 após concentração 10 vezes em polietilenoglicol (PEG), sendo aplicados 30  $\mu$ g de proteína por poço, neste gel observamos a presença de bandas com maior intensidade que foram numeradas de 1 a 4.



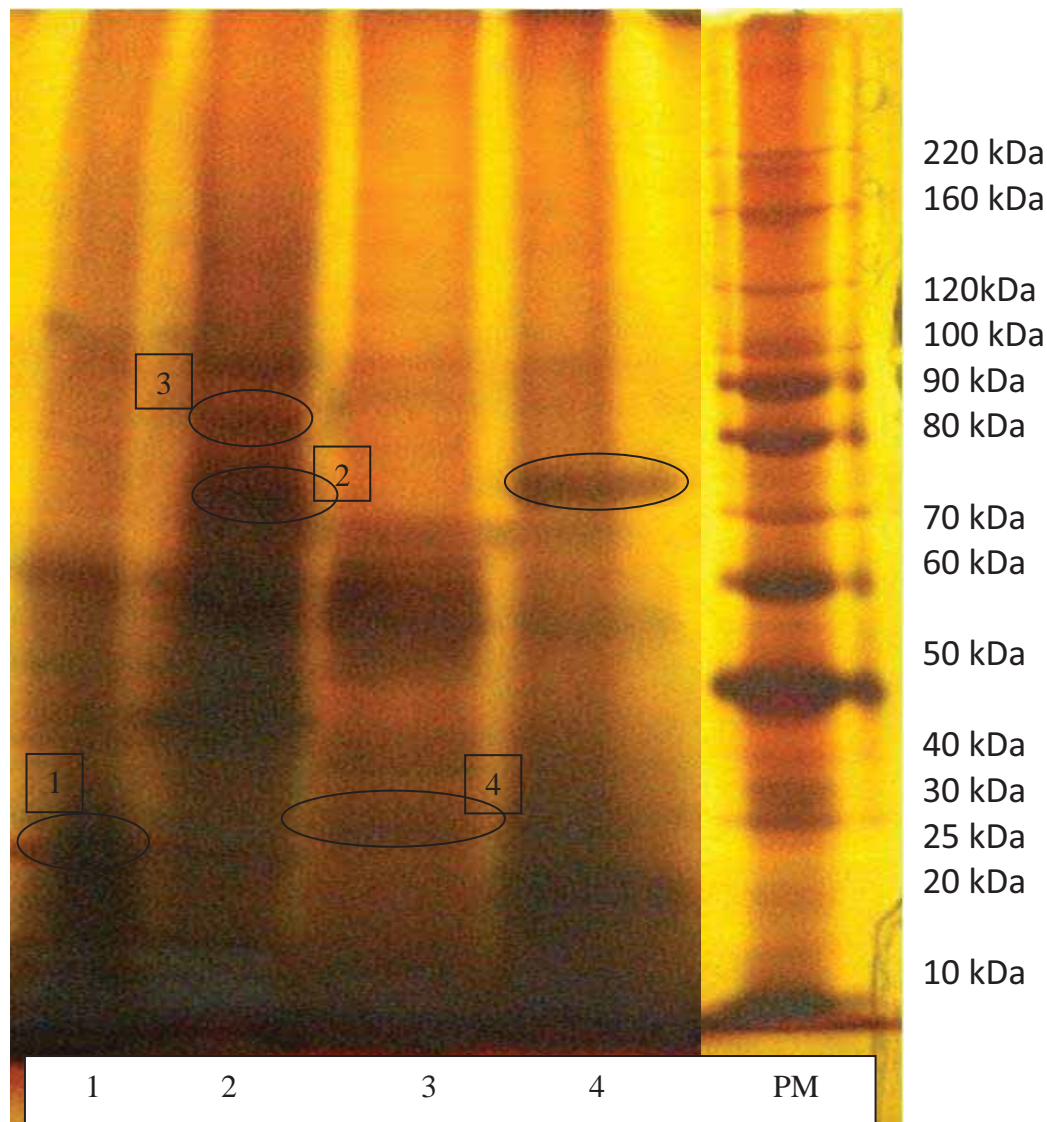


Figura 33: Gel SDS-PAGE, linhagem Tr. Coluna:1- Tr1 Controle 14 dias, 2- Tr1 frente a F Hex por 14 dias, 3- Tr1 frente a F Hex +7 dias, 4-Tr1 frente a Anfotericina B +7 dias, PM=Peso molecular

Na coluna 1, com o fungo em condição controle por 14 dias, observa-se uma banda de aproximadamente 22 kDa(1) que está presente também na coluna 2, onde o fungo foi desenvolvido em presença da FHex por 14 dias, porém ausente nas demais. Na coluna 2 observa-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 86 kDa (3) que não aparece em nenhuma outra condição. Na mesma coluna observa-se a presença de banda de aproximadamente 73 kDa (2) que também está presente na coluna 4, onde o fungo foi desenvolvido em presença de anfotericina B. Na coluna 3 onde o fungo desenvolveu por 7 dias e após este período foi adicionado a F Hex ficando em contato por mais 7 dias, observa-se uma banda de

aproximadamente 25 kDa, que não e foi demonstrada em nenhuma outra condição.

## 5.12.2 Análise do perfil proteico através de eletroforese 2D

### 5.12.2.1. Análise do perfil proteico através de eletroforese 2D da linhagem

#### Mc.

Na figura 34, observa-se os spots diferentemente expressos na linhagem Mc nas condições de controle e frente a fração hexano. Na tabela 26 estão demonstrados os spots diferentemente expressos na linhagem Mc na condição controle quando comparada com a tratada com FHex.

Tabela 26: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição controle comparada a condição FHex.

Spot	Massa molecular (kDa)	Alteração na expressão na condição de tratamento com FHex
8	115,0	Diminuição de 1,05 X
11-15	77,0	Desaparecimento
28	40,0	Diminuição de 2,68 X
29	38,0	Desaparecimento
36	33,0	Diminuição de 4,29 X
39	33,0	Diminuição de 10,74 X
44	32	Aparecimento
40-43	27,0	Desaparecimento
48	36,0	Aparecimento

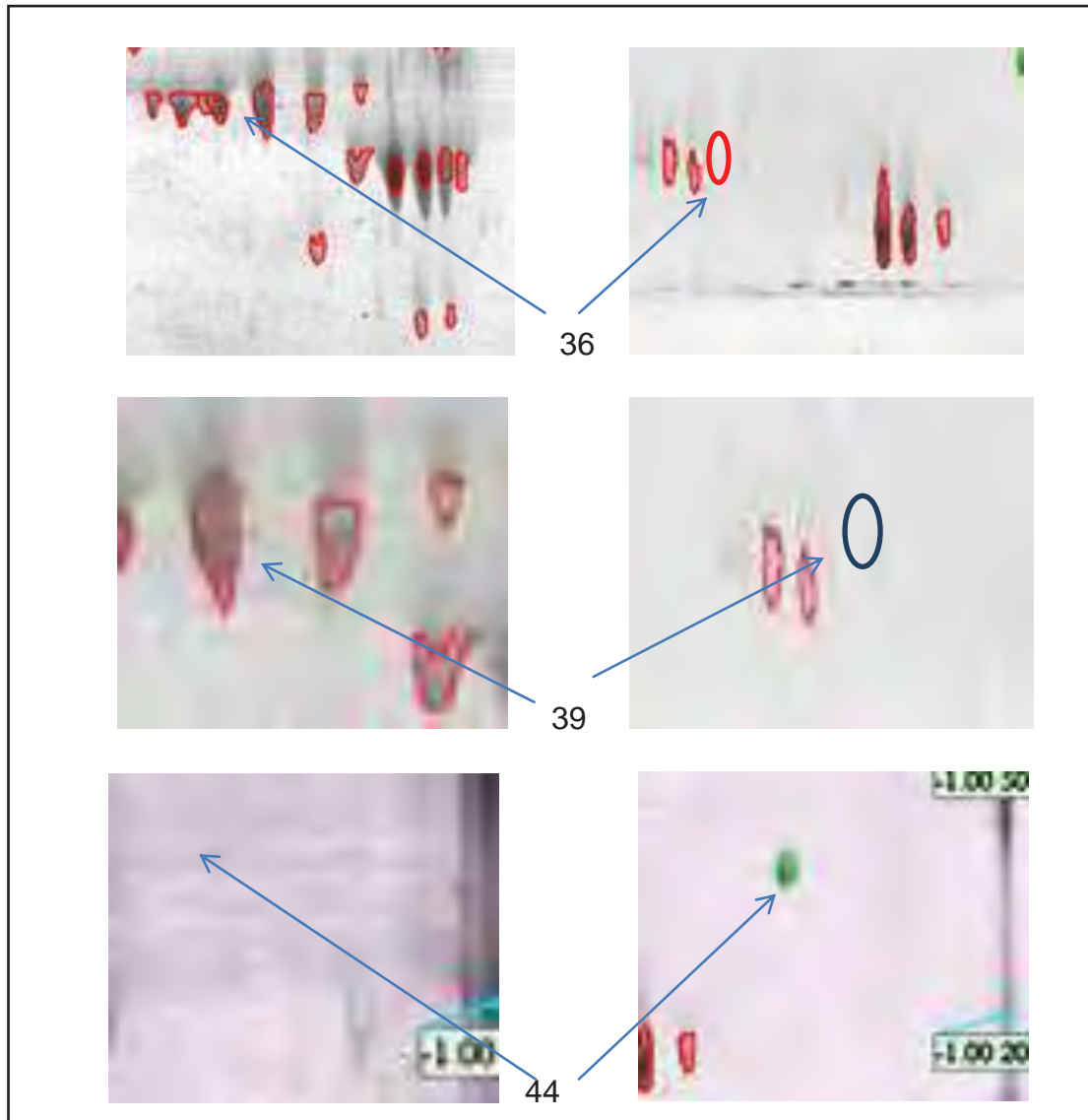


Figura 34: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição controle quando comparada com a tratada com FHex

Pelas características encontradas para os spots 36 a 39 podem sugerir tratar-se de uma proteinase de 33 kDa, isolada purificada e caracterizada por Lee et al. (1987). A diminuição da expressão desta proteína pode indicar uma diminuição da atividade queratinolítica, reduzindo a capacidade de penetração do fungo no tecido do hospedeiro. Observa-se o desaparecimento de spots de 77 kDa, 38 kDa e 27 kDa, diminuição da expressão em spots de 115,0 kDa, 40,0 kDa e 33 kDa e surgimento de spot de aproximadamente 36,0 kDa.

Na figura 35 e 36 estão demonstrados os spots diferencialmente expressos quando comparada a situação controle e o fungo frente ao voriconazol.

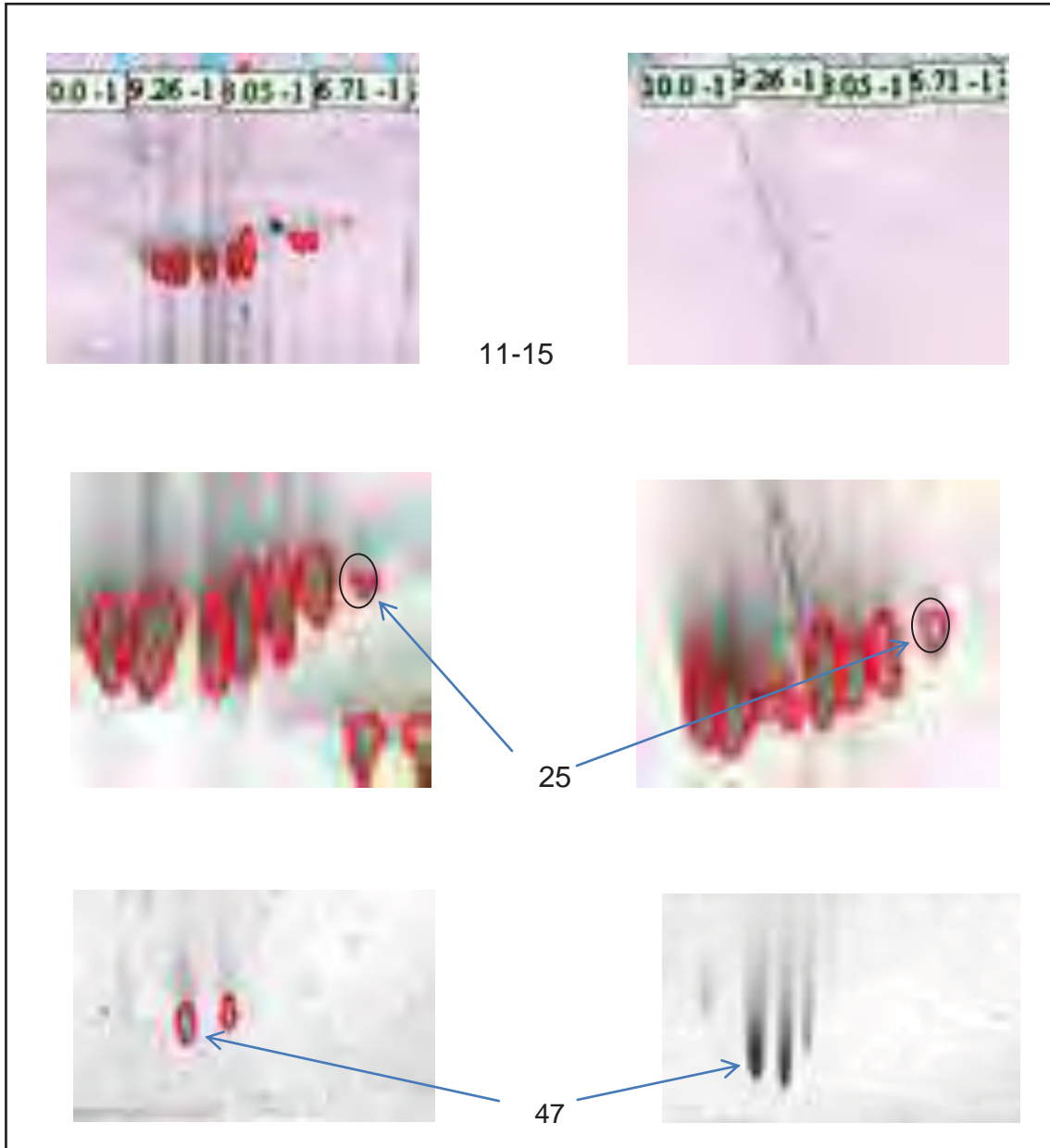


Figura 35: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc controle frente ao voriconazol

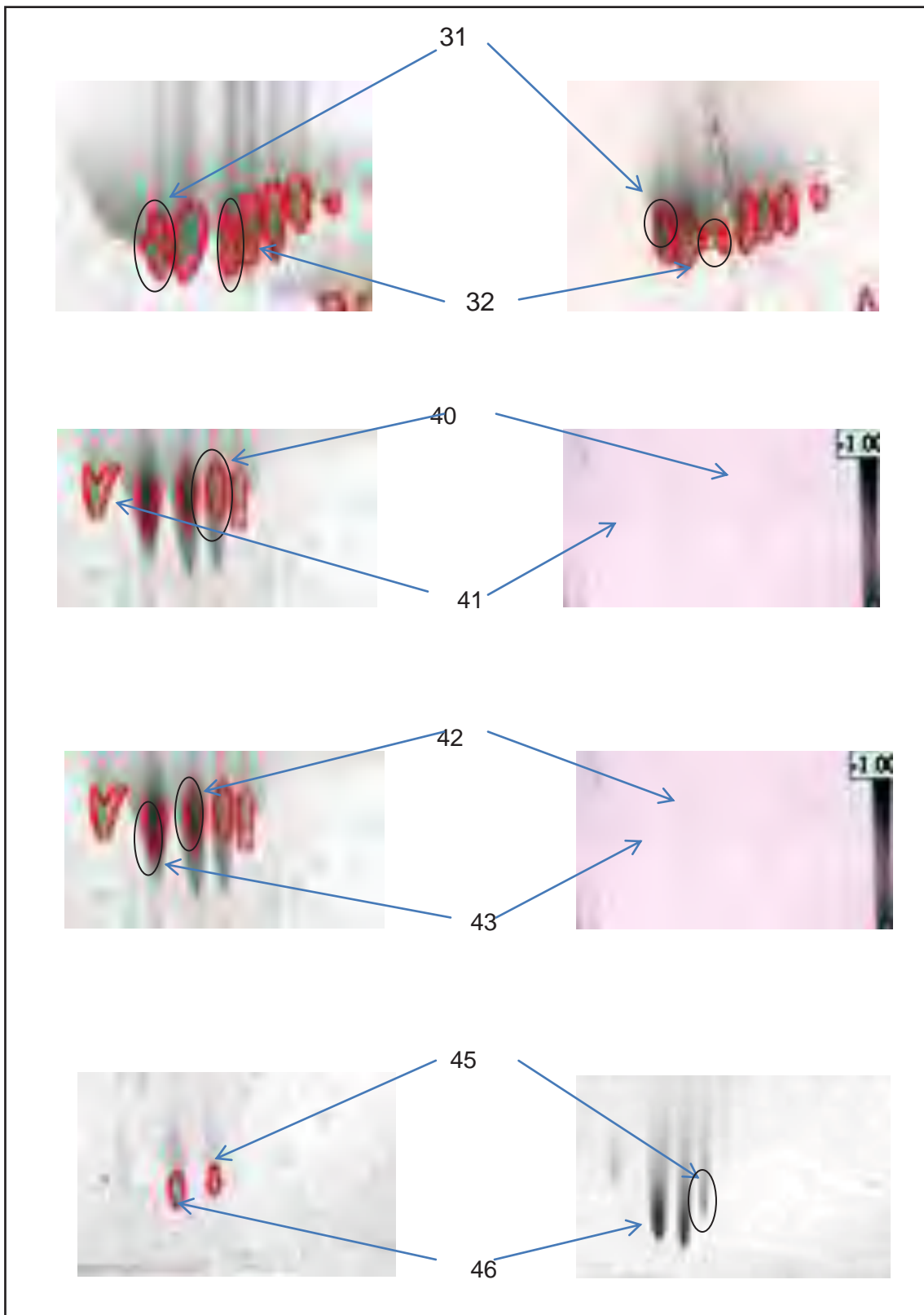


Figura 36: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc controle frente ao voriconazol

Na tabela 27 estão demonstrados os spots diferentemente expressos na linhagem Mc na condição controle quando comparada com a tratada com voriconazol.

Tabela 27: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição controle comparada a condição voriconazol.

Spot	Massa molecular (kDa)	Alteração na expressão na condição de tratamento com voriconazol
11-15	77,0	desaparecimento
23	44	desaparecimento
25	40	Aumento 4,9 x
31	38	Aumento 2,7 x
32	38	Diminui 2,36 x
40	28	Desaparecimento
41	28	Desaparecimento
42	27	Desaparecimento
43	26	Desaparecimento
45	12	Aumento 4,09 x
46	11	Aumento 6,64 x
47	10	Aparecimento

Quando a linhagem Mc foi tratada com voriconazol observou-se o desaparecimento de spots de 77, 44, 28, 27 e 26 kDa, diminuição da expressão de spot de 38 kDa, aumento na expressão de spots de 40, 38, 12 e 11 kDa e o aparecimento de spot de 10 kDa. Na tabela 28, estão demonstrados spots da linhagem Mc frente ao voriconal e FHex.

Tabela 28: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc frente ao voriconazol e frente a FHex.

Spot	Massa molecular (kDa)	Alteração na expressão na condição de tratamento com voriconazol
10	32	Desaparecimento
11	32	Desaparecimento
12	23	Aumento 3,84 X
13	22	Aumento 4,29 X
16	17	Diminuição 4,54 X

Quando comparamos a condição de tratamento com voriconazol e FHex, observa-se que na condição de tratamento com voriconazol ocorreu aumento na expressão de spots de 22 e 23 kDa, diminuição de spot de 17 kDa e a não expressão de spot de 32 kDa.

Na figura 37 podemos observar spots diferencialmente expressos da linhagem Mc.



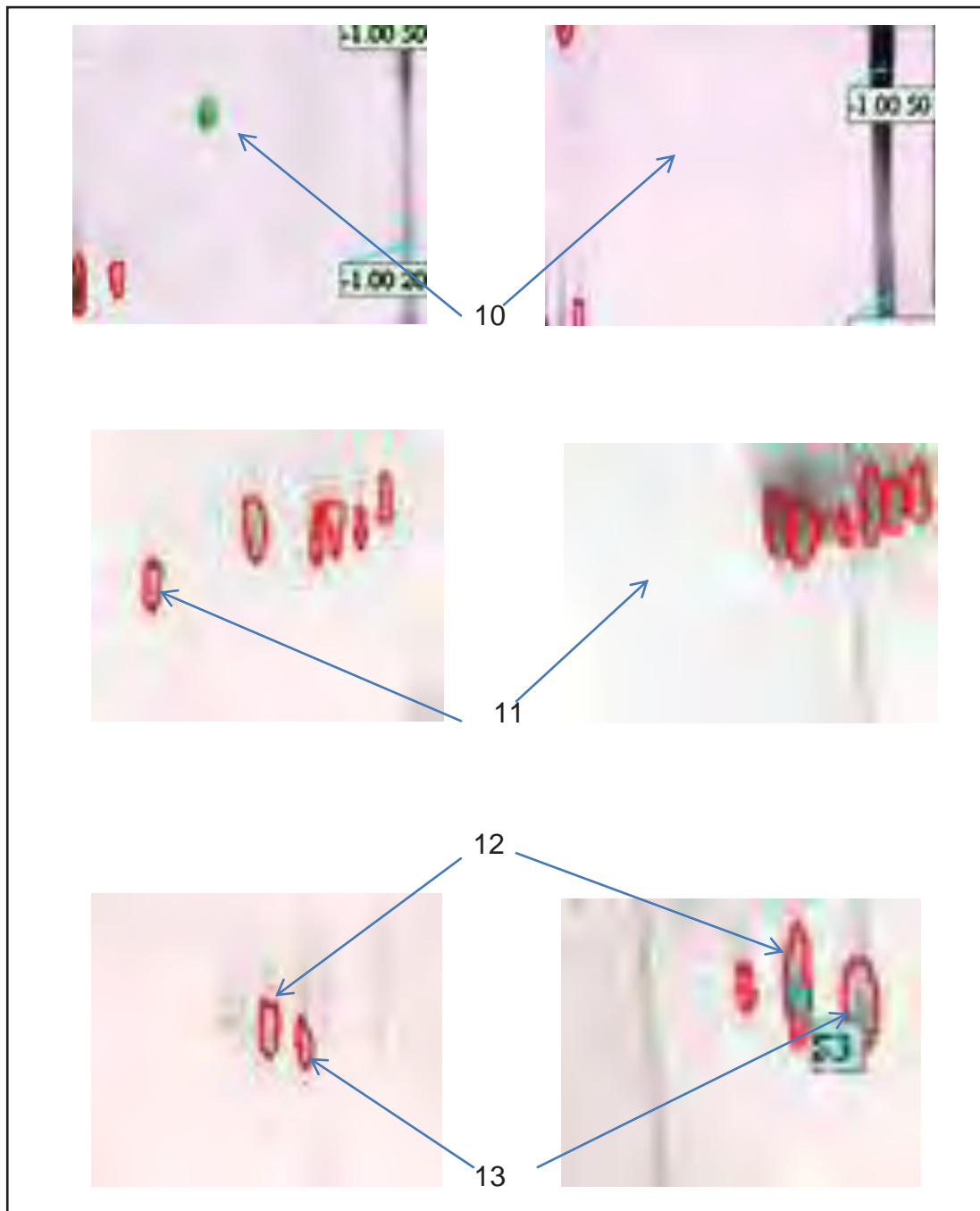


Figura 37: Spots diferencialmente expressos na linhagem Mc na condição de tratamento frente a FHex e voriconazol

No spot 10, observa-se a presença de uma mancha correspondente a 32 kDa em FHex que não está presente quando o fungo foi desenvolvido em presença de voriconazol. No spot 11 observa-se a presença de uma proteína de aproximadamente 32 kDa presente na condição tratamento frente a FHex que não está presente quando o fungo foi tratado com voriconazol. Dados da literatura (MIGNON, et al., 1998) descrevem uma proteína queratinolítica de 31,5 kDa.



### 5.12.2.2. Análise do perfil proteico através de eletroforese 2D da linhagem

#### Tr1

Na figura 38, estão demonstrados os spots diferencialmente expressos quando comparamos a condição controle da linhagem Tr1 com a condição de tratamento com FHex.

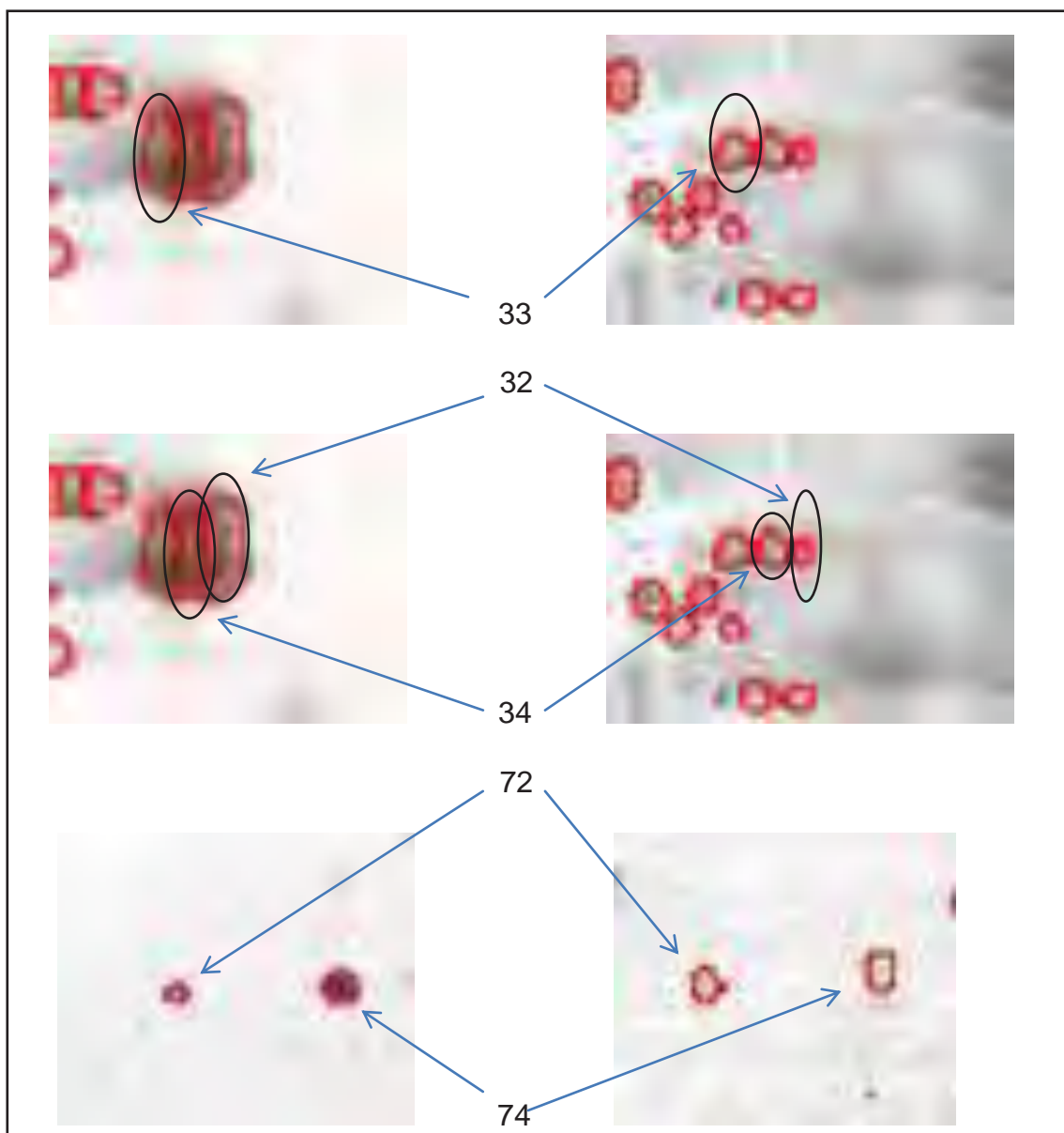


Figura 38: Spots diferencialmente expressos na linhagem Tr1 na condição controle e tratamento frente a FHex

Na tabela 29, estão demonstrados spots na linhagem Tr1 na condição controle e tratamento frente a FHex.

Tabela 29: Spots diferencialmente expressos na linhagem Tr1 frente ao na condição controle e frente a condição FHex.

Spot	Massa molecular (kDa)	Alteração na expressão na condição de tratamento com FHex
33	41	Diminuição 16,25 x
32	42	Diminuição 10,24 x
34	42	Diminuição 10,59 x
47	32	Aumento 5,40 x
72	17	Diminuição 1,04 x
74	17	Diminuição 5,4 x

Observa-se que na presença da fração FHex houve diminuição da expressão em spots com proteínas de 41,42 e 17 kDa, o spot 47 de representativo de uma proteína de 32 kDa apresentou aumento na sua expressão.

Na figura 39, estão demonstrados os spots diferencialmente expressos quando comparamos a condição controle da linhagem Tr1 com a condição de tratamento com voriconazol

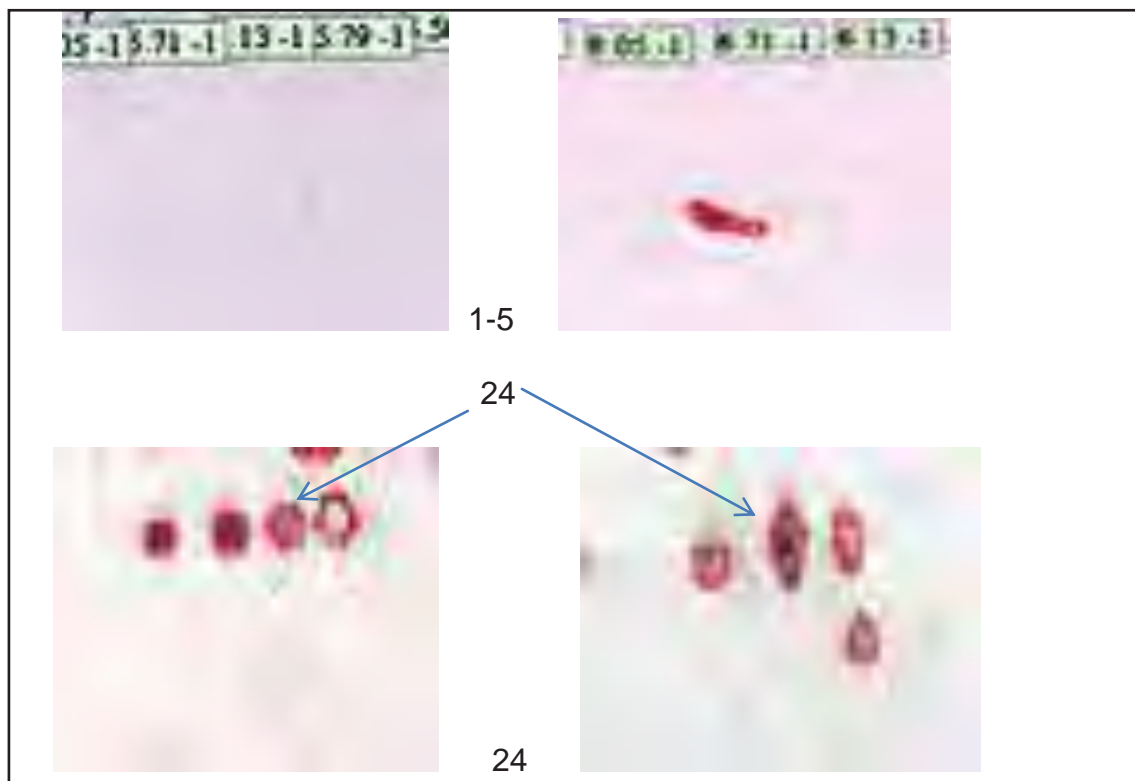


Figura 39: Spots diferencialmente expressos na condição controle da linhagem Tr1 com a condição de tratamento com voriconazol

Na tabela 30, estão demonstrados spots na linhagem Tr1 na condição controle e tratamento frente ao voriconazol.

Tabela 30: Spots diferencialmente expressos na linhagem Tr1 na condição controle e tratamento frente a voriconazol

Spot	Massa molecular (kDa)	Alteração na expressão na condição de tratamento com voriconazol
1-5	69-72	Aparecimento
24	33	Aumento 1,32 x
25	32	Aparecimento
27	33	Diminuição 1,09 x
28	33	Diminuição 2,24 x
30	26	Aparecimento

Observa-se que na condição de tratamento com voriconazol, houve um aumento de expressão de proteína com 33 kDa (spot 24), diminuição da expressão de proteína de 33 kDa (spot 27e 28) em níveis variáveis e aparecimento de proteínas de 69, 72, 32 e 26 kDa (spots 1-5, 25, 30)..

### 5.12.3 Análise do perfil proteico por Zimografia

A figura 40 apresenta o resultado da zimografia em gel com gelatina, da linhagem Tr1. Observa-se a presença de mancha clara no fundo azul corado por comassie, demonstrando a ação da proteína presente no filtrado fúngico sobre o substrato na situação controle e frente a FHex.



Figura 40: Zimografia em gel de gelatina do filtrado fungico da linhagem Tr1. Coluna 1 Tr1 controle, coluna 2 Tr1 frente a FHex

Na figura 41 apresenta-se a zimografia em gel de gelatina da linhagem Mc frente a FHex. Observa-se mancha clara no fundo escuro corado por comassie, devido a ação sobre o substrato (gelatina) demonstrando a atividade proteolítica das proteínas presentes no filtrado fúngico.



Figura 41: Zimografia em gel com gelatina linhagem Mc. 1- condição controle, 2- condição de tratamento frente a FHex

### 5.13. Germinação de esporos

Quando testada a linhagem Tr1 frente a fração FHex, observou-se germinação de esporos na concentração de 19,53  $\mu\text{g/ml}$ , não sendo observada germinação nas concentrações maiores. A linhagem Tr FOC, quando testada frente a fração FHex, mostrou germinação somente em concentrações menores que 19,53  $\mu\text{g/ml}$  enquanto que frente a anfotericina B em concentrações menores que 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ . Nossos resultados são similares aos apresentados por Koroishi et al. (2008). Na figura 42 pode ser observada a germinação de esporos de linhagem Tr1.

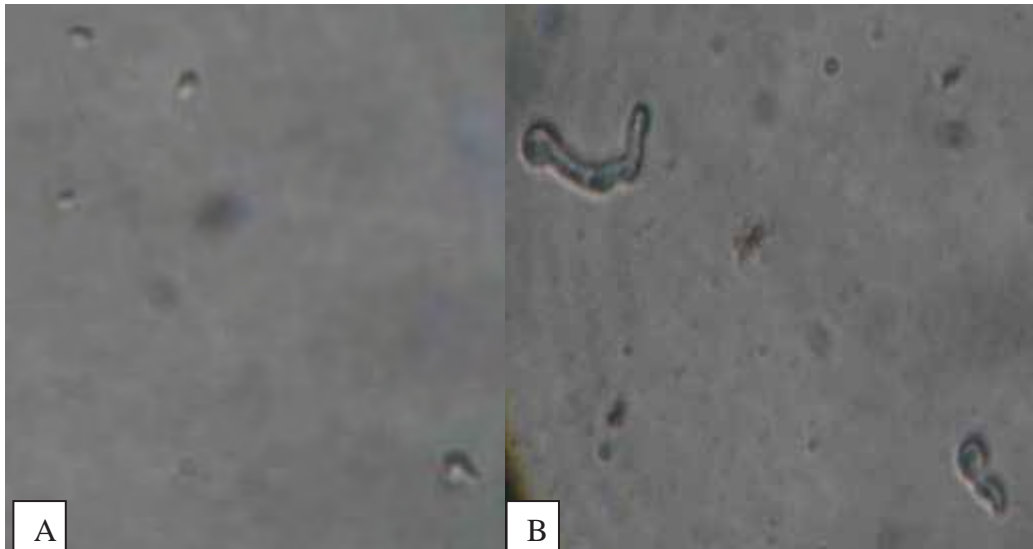


Figura 42: Germinação de esporos da linhagem Tr1 frente a fração FHex. A: Esporos não germinados. B: Esporos germinados

#### 5.14. Alterações no desenvolvimento da hifas

Após o desenvolvimento da linhagem Tr1 por 5 dias em placa de Petri com meio Sabouraud e em meio Sabouraud adicionado da fração FHex de *P. umbellata*, observa-se modificações no padrão de desenvolvimento das hifas nas condições de tratamento com aumento do aparecimento de hifas laterais proporcional ao aumento da concentração. (figuras 43, 44, 45, 46)

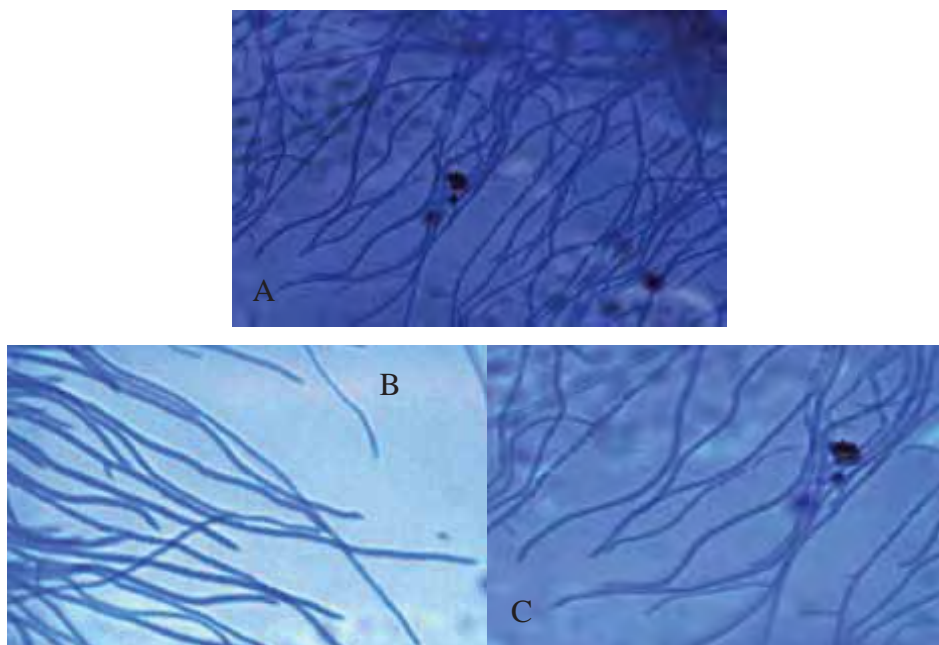


Figura 43: Hifas da linhagem Tr1 (sem tratamento). A aumento 20x, B e C aumento 40x.

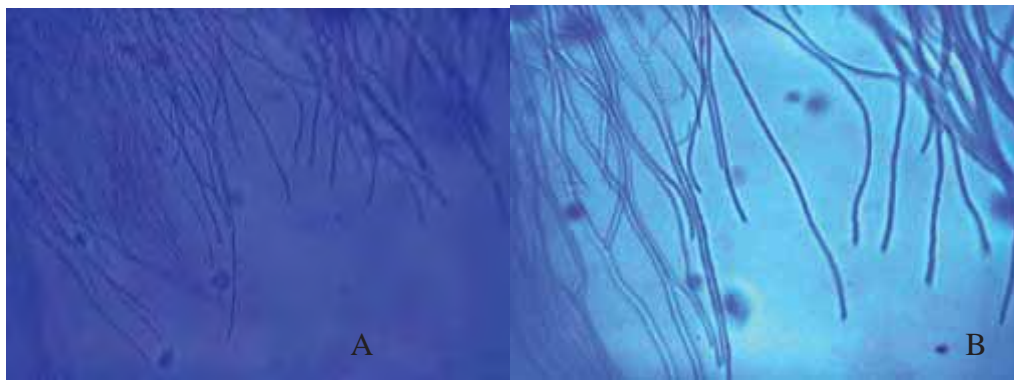


Figura 44: Hifas da linhagem Tr1, tratamento CIM (9,76  $\mu\text{g/mL}$ ). A aumento 20x, B aumento 40x.

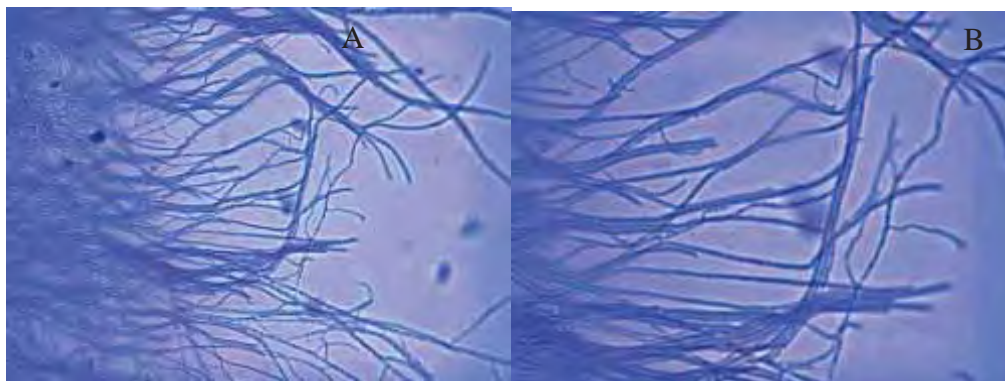


Figura 45: Hifas da linhagem Tr1, tratamento 2 x CIM (19,52  $\mu\text{g/mL}$ ). A aumento 20x, B aumento 40x.

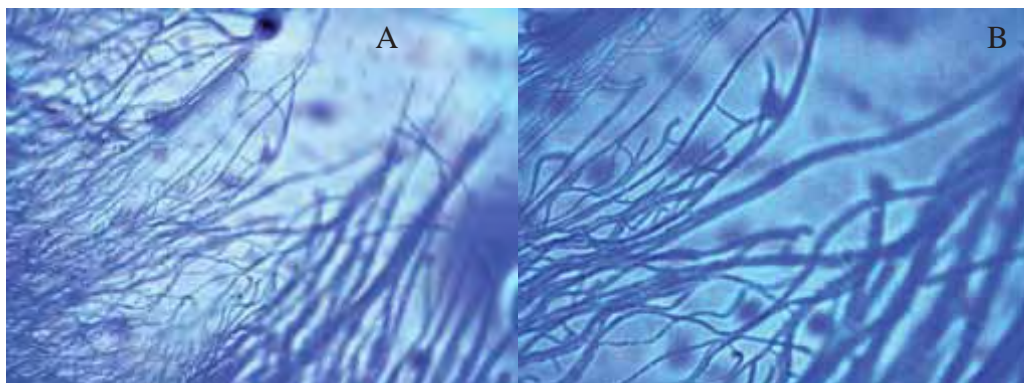


Figura 46: Hifas da linhagem Tr1, tratamento 4 x CIM (39,04  $\mu\text{g/mL}$ ). A aumento 20x, B aumento 40x.



### 5.15. Avaliação do sinergismo

Os resultados referentes ao sinergismo, estão demonstrados na tabela 31.

Tabela 31: Avaliação do sinergismo

Conc. Fluconazol µg/mL	Conc. FHex µg/mL	ICF	Atividade
2	78,12	5	Antagônica
0,0035	78,12	1,0	Indiferente
0,125	39,06	0,75	Aditiva
0,062	39,06	0,624	Aditiva
0,0015	39,06	0,503	Aditiva
0,0075	39,06	0,515	Aditiva
0,0035	39,06	0,507	Aditiva

Os resultados apresentados na tabela 6 demonstram que a fração FHex não apresentou efeito sinérgico sobre o fluconazol, apresentando apenas efeito aditivo e em alguns casos efeito antagônico ou indiferente.



## 6- Discussão

A análise fitoquímica da droga vegetal de *P. umbellata* demonstrou a presença de taninos e flavonoides como já havia sido evidenciado por Januário (1994).

Os constituintes químicos encontrados nos ensaios preliminares estão de acordo com relatos da literatura (PERAZZO,2006; JANUARIO,1994; MESQUITA et al, 2005), com presença de flavonoides, e ainda óxido de cariofileno, terpenos, demonstrado pela cor das manchas após revelação das placas de CCD com anisaldeído sulfúrico.

Baseando-se nas CCD Comparativas observamos que algumas frações apresentam manchas com mesmo Rf, e mesmas características, enquanto outras frações como a F01 apresentam manchas com Rfs diferentes indicando diferentes constituintes químicos. Apesar da diferença no padrão cromatográfico todas apresentaram ação antifúngica e possivelmente, esta diferença no perfil cromatográfico pode indicar que diferentes substâncias presentes em *P. umbellata* podem estar relacionadas com a ação demonstrada pelo extrato da planta.

Como agentes antimicrobianos, os óleos essenciais podem ser considerados de baixo risco para o desenvolvimento de resistência microbiana, devido a mistura de componentes em sua composição que levaria a diferentes mecanismos de ação antimicrobiana (DAFERERA et al, 2003).

O rendimento de 0,203%, obtido da extração do óleo essencial é considerado baixo, embora estando próximo a valores encontrados por outros autores, Mattana (2005) também encontrou um rendimento muito baixo no teor de óleo essencial de *P. umbellata* da ordem de 0,2 a 0,6%, enquanto Mesquita et al (2005) encontrou 0,3%. Bergamo (2003) relatou baixo rendimento de cerca de 0,02%.

A análise do óleo essencial de *P. umbellata* demonstrou a presença de beta linalol, alfa cubebeno, cubebeno, copaeno, cariofileno, gama cadieno, cadieno e espatulenol. Trabalhos descritos na literatura também revelam estes constituintes no óleo essencial da planta (MESQUITA, et al 2005; MARTINS et al, 1998, LUZ et al., 1999 *apud* ROERSCH, 2010; BERGAMO, 2003). Os resultados de CIM demonstraram valores entre 0,0312% para linhagem Tr1 a 0,25% para a linhagem Tm.

Em trabalho realizado por Bansod e Rai (2008) na Índia, testando óleo essencial obtido de várias plantas, utilizando a metodologia de microdiluição, foram obtidos os seguintes valores de CIM: *Allium sativum* maior que 4 %, *Cymbopogon martini* 0,03%, *Eucalyptus globulus* 0,06%, *Mentha spicata* 0,12%, contra *Aspergillus fumigatus* e *A. niger*. Foi avaliado também uma mistura de óleos essenciais das espécies *C. martinii*, *C. citratus*, *E. globulus* e *Cinnamomum zeylanicum*, com CIM de 0,008 % para *Aspergillus fumigatus* e 0,06 % para *A. niger* o que justificaria o uso tradicional desta mistura de óleos essenciais no tratamento de infecções micóticas em pacientes com tuberculose.

Santos et al (2010), em estudo com *Croton campestris* e *Ocimum gratissimum* contra *T. rubrum* (ATCC 1683) obteve CIM de 1024 µg/mL para o extrato metanólico de *Croton campestris* e 512 µg/mL para o extrato hexânico da mesma planta, para *Ocimum gratissimum* os resultados de CIM foram de 512 µg/mL para o extrato metanólico e 256 µg/mL para o extrato hexânico.

Os resultados de CIM de nosso trabalho demonstraram melhor ação para a FHex (9,76 µg/mL), com inibição da germinação de esporos a partir da concentração 19,53 µg/ml. Estes resultados indicam uma possível ação fungistática da fração, pois na presença desta fração em concentrações superiores o fungo não germina, portanto não desenvolve nem se reproduz, podendo deste modo facilitar que as defesas imunológicas do organismo do paciente infectado atuem na eliminação do patógeno.

Os valores de CIM encontrados neste trabalho tanto para os extrato etanólico EtOH 70 quanto para a fração FHex, são menores que os relatados por Rodrigues (2007), porém deve-se levar em conta a origem da planta, assim como época de coleta e condições climáticas, além do método de extração, que podem ter influenciado no resultado. Tais resultados são promissores, necessitando de um maior fracionamento do extrato para determinar a existência de uma única substância responsável pela ação ou se esta ação esta relacionada a um grupo de substâncias.

O desenvolvimento de um antifúngico requer a execução de testes de segurança e, portanto procuramos avaliar a citotoxicidade. Nos experimentos frente a linhagem de macrófagos J774 a fração Clorofórmio (FClor) apresentou maior IC<sub>50</sub>, o EtOH 70 a fração F2, FRes, e a substância 2 (subs. 2)

apresentaram IC<sub>50</sub> que podem ser considerados como moderadamente tóxicas. A fração hexano (FHex) e a FAc apresentaram IC<sub>50</sub> de baixos valores. A fração F2C e o 4-NC (subs. 1) apresentaram IC<sub>50</sub> menor que 15,625 µg/mL, demonstrando maior toxicidade para linhagem celular testada, assim como o óleo essencial que apresentou um IC<sub>50</sub> de 0,014%. Nos estudos de Perazzo (2006) o 4-NC apresentou um IC<sub>50</sub> de 0,4 µg/mL para células HL-60, demonstrando ser a substância maior citotoxicidade entre as testadas. A presença de 4-NC na fração F2C pode explicar sua maior toxicidade.

Para o ensaio de toxicidade *in vitro*, frente a linhagem de macrófagos J774, observou-se menor toxicidade para o EtOH 70 quando comparado a FHex com IC<sub>50</sub> de 40,05 µg/mL. O extrato etanólico também apresentou menor citotoxicidade frente a linhagem de fibroblastos da córnea de coelho SIRC ATCC CCL60 quando comparada FHex (IC<sub>50</sub>= 185,5 µg/mL). Na literatura encontramos outros resultados de citotoxicidade como por exemplo IC<sub>50</sub> de 5,3 ± 0,4 µg/mL para o extrato etanólico de *P. umbellata*, frente a células HL-60 (PERAZZO, 2006). Para extrato diclorometano foram encontrados os seguintes resultados de concentração mínima que causa Inibição Total do Crescimento (TGI), 5,73 µg/mL para linhagem UACC-62, 8,96 µg/mL para linhagem MCF-7, 4,28 µg/mL para linhagem NCI-H460 e 1,55 µg/mL para linhagem K-562 (SACOMAN et al, 2008) demonstrando que o extrato diclorometano apresenta toxicidade para células de linhagens tumorais.

Em nosso estudo notamos que outras frações do extrato EtOH 70 de *P. umbellata* apresentam ação antifúngica (FRes, Fint, F01 e F4C) e devem apresentar diferentes constituintes quando comparadas com a FHex, portanto tais frações devem ser testadas buscando possíveis sub frações que possam apresentar uma menor toxicidade "*in vitro*".

Também avaliamos a citotoxicidade "*in vitro*" frente à linhagem fibroblastos da córnea de coelho SIRC ATCC CCL60. Observou-se baixa toxicidade para o EtOH 70, enquanto a fração FHex apresentou maior citotoxicidade. Estes resultados de citotoxicidade do nosso trabalho podem demonstrar uma potencialidade, da fração FHex, para utilização como antitumoral, porém estudos mais detalhados devem ser realizados.

Comparando os resultados de CIM e toxicidade *in vitro*, podemos observar que extratos e frações que apresentaram bons valores de CIM como o EtOH 70 e a FClor apresentam baixa toxicidade *in vitro*, aumentando a possibilidade de sua futura utilização como antifúngico. Entretanto a fração FRes que também apresentou um valor de CIM baixo teve toxicidade moderada. A FAc exibiu valor de CIM e IC<sub>50</sub> bem baixo, mas com valores muito próximos, o que pode inviabilizar sua utilização como antifúngico, porém deve ser investigada sua ação antitumoral. O 4-NC e a fração F2C apresentaram CIM baixos e para a linhagem Tr1, demonstrando serem bem eficazes contra o fungo, porém muito tóxicas, com IC<sub>50</sub> < 15,625 µg/mL. A fração F2C apresenta no perfil cromatográfico em CCD presença de mancha compatível com 4-NC, o que pode explicar sua alta toxicidade. Pinto et al (2006) demonstrou atividade citotóxica do 4-NC isolado de *Pothomorphe peltata* frente a linhagens de células tumorais. A FHex apresentou um bom valor de CIM, mas demonstrou ser citotóxica para as linhagens celulares testadas. Do mesmo modo, o óleo essencial apesar de apresentar um bom resultado de CIM, demonstrou alta toxicidade, pois o IC<sub>50</sub> (*in vitro*), encontrado foi de 100 µg/mL (0,014%) e o menor valor de CIM 223,00 µg/mL (0,0312%).

Para a toxicidade *in vivo* observamos ausência de toxicidade aguda para o extrato EtOH 70 na dose de 2 g/Kg. Este resultado é similar ao apresentado por Barros et al. (2005), que não observou toxicidade aguda nos animais onde foram administrados 1, 2 ou 5g/Kg do extrato hidroalcoólico de raiz de *P. umbellata*. Em nosso estudo, para a partição hexano, observou-se morte de 3 dos 5 animais testados, demonstrando toxicidade na dose de 2 mg/Kg. Provavelmente nesta fração existam substâncias com maior toxicidade, possivelmente substâncias apolares, inclusive 4-NC, estando concentradas devido as características do solvente. Por outro lado no extrato EtOH 70, que não apresentou toxicidade *in vivo* na concentração de 2 mg/Kg, estas substâncias podem estar diluídas, não apresentando portanto toxicidade aguda.

Em presença de voriconazol e fluconazol os fungos apresentaram diminuição da síntese do ergosterol. Estes fármacos são agentes antifúngicos triazólicos, tendo seu mecanismo de ação ligado a inibição da 14- $\alpha$ -demetilase, o que leva a depleção da síntese do ergosterol, resultando na formação de

membrana plasmática com alterações estruturais e funcionais (GHANNOUM & RICE, 1999). A diminuição da síntese de ergosterol foi demonstrada em nossos experimentos quando comparamos a porcentagem de ergosterol da linhagem Tr1 na condição controle (0,020 %) e em presença de voriconazol (0,013%) e fluconazol (0,007%). Na presença da fração FHex a porcentagem de ergosteol foi de 0,018%, também demonstrando diminuição da porcentagem quando comparada a situação controle (0,020%), este resultado indica um possível mecanismo de ação de FHex relacionado a síntese do ergosterol, haja visto que assim como em presença de voriconazol e fluconazol observa-se diminuição da porcentagem.

Três classes de antifúngicos (azóis e morfolinas e alilaminas) tem como alvo enzimas que catalisam reações iniciais na via de biossíntese do ergosterol. O fluconazol tem como alvo a lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase (Erg11) bloqueando a ação da enzima (ZHANG e RAO, 2010; ALVAREZ et al., 2007)

Analizando os géis de eletroforese bidimensional para a linhagem Mc observou-se dois spots de 33 kDa que tiveram sua expressão diminuída frente ao tratamento com FHex. Lee et al., (1987), descreveu uma protease com atividade queratinolítica de 33 kDa em *M. canis*, que parece estar associada a mecanismos de invasão tecidual. Podemos supor que se as bandas de 33 kDa de nosso estudo também forem proteases queratinolíticas, sua menor expressão, devido ao tratamento com FHex, pode levar a uma diminuição da capacidade do fungo em invadir tecido queratinizado e assim dificultar o mecanismo de invasão. Na condição de crescimento da linhagem Mc frente a FHex, observou-se a presença de um spot com massa molecular de 32 kDa e pl 3,78 que não foi observado nas outras condições de crescimento. Na condição onde o fungo se desenvolveu em presença de voriconazol, observou-se que um spot de 44 kDa presente no controle não está expresso na condição de tratamento com voriconazol. Não encontramos na literatura dados sobre proteína de *M. canis* com peso molecular de 44 kDa expressa nas mesmas condições que trabalhamos. Na condição onde a linhagem fúngica Mc foi desenvolvida em presença de voriconazol observou-se o desaparecimento de spot de 27 e 28 kDa. Na literatura encontramos uma proteinase de 27 kDa e pl 5,0 expressa em *T. rubrum*, a qual pode degradar fibronectina, laminina, colágeno tipo II e IV, podendo ser considerada como uma proteinase geral,

semelhante à tripsina ou quimotripsina e poderia também catalisar a hidrólise de queratinas que foram previamente atacadas e desnaturadas por queratinases reais (APODACA e MC KERROW, 1989). A proteína de 27 kDa encontrada em nossos estudos apresenta pI de 5,15, podendo ser semelhante a proteinase de 27 kDa de *T. rubrum*, neste caso a não expressão desta proteína pode dificultar a invasão do tecido queratinizado pelo fungo, deste modo diminuindo fonte de nutrientes para o fungo e conseqüentemente a infecção do tecido. Uma proteína de 33 kDa, em *M. canis*, que estaria relacionada atividade queratinolítica, diminuindo a capacidade de penetração do fungo no tecido do hospedeiro foi isolada, purificada e caracterizada por Lee et al. (1987). Observou-se em nossos resultados a diminuição da expressão de duas proteínas de 33 kDa quando o fungo foi colocado frente a FHex, e tal diminuição da expressão pode indicar uma diminuição da capacidade fúngica em penetrar no tecido do hospedeiro e deste modo diminuiria a infecção.

Analisando os géis de SDS-PAGE, observamos que na linhagem *M. canis* ocorreu o desaparecimento de uma banda de aproximadamente 31,0 kDa quando o fungo foi colocado em presença da fração hexano (FHex). A banda de aproximadamente 31,0 kDa que desapareceu em nossos experimentos poderia se tratar de uma queratinase como a de 31,5 kDa identificada por Mignon et al (1998) com importante papel na patogênese da infecção. A diminuição desta banda em nosso estudo pode indicar que na presença da FHex o fungo pode apresentar dificuldade na infecção do hospedeiro. Outras bandas sofreram alterações frente ao extrato vegetal, como o aparecimento uma banda de aproximadamente 70 kDa que pode se tratar de metaloprotease. Giddey et al. (2007) identificou como metaloproteases duas proteínas de 69,3 kDa e 70,1 kDa presentes em *T. rubrum* e *T. violaceum* respectivamente. Metaloproteases como a Mep3 e Mep4 são produzidas por fungos durante a infecção no hospedeiro (PERES, et al. 2010). Estas devem ser melhor estudadas a fim de identificá-las e determinar sua importância no metabolismo fúngico.

Na literatura uma proteína de 80,1 kDa foi identificada por Giddey et al. (2007) em *T. violaceum* como uma dipeptidil-peptidase V e em *M. canis* esta enzima está relacionada com virulência e degradação de substratos (PERES, et al. 2010). Em nossos estudos um banda de aproximadamente 80 kDa foi



observada na condição de tratamento da linhagem Tr1 frente ao fração FHex e F2 de *P. umbellata*, Nesta linhagem observou-se também a presença de uma banda de aproximadamente 86 kDa presente na condição de crescimento frente a FHex por 14 dias que deve ser melhor estudada visando sua caracterização, pois na literatura encontra-se descrita uma proteína de 88 kDa como dipeptidil-peptidase IV presente em *T. rubrum* e uma suposta glicose-6-fosfato isomerase de *T. violaceum* com 87,2 KDa (GIDDEY et al, 2007).

Uma banda de 73 kDa foi observada na condição de tratamento frente a fração FHex+7 e anfotericina B+7, demonstrando uma resposta fúngica similar, que pode indicar um ação sobre as mesmas vias biossintéticas. Ainda frente à linhagem Tr1 observou-se que uma banda de aproximadamente 25 kDa presente na situação de tratamento com FHex+7 e na literatura encontram-se descritas várias proteínas com peso molecular próximo a 25 KDa, como glutaciona redutase, fosfolipase A2, 1,2  $\alpha$ -D- manosidase (GIDDEY et al, 2007). Uma banda de aproximadamente 22 kDa presente na situação de controle e frente a FHex por 14 dias, não foi observada na condição de tratamento com FHex+7 e anfotericina B+7. Na literatura encontram-se descritas proteínas com peso molecular próximo a 22 kDa, como uma possível carboxipeptidase de 21,9 kDa, uma fosfatase alcalina de 23,5 kDa (GIDDEY et al., 2007).

Na análise do perfil proteico através de eletroforese bidimensional da linhagem Tr1, encontramos em nossos resultados proteínas com massa molecular de 41 e 42 kDa e outras de 17 kDa que tiveram sua expressão diminuída quando em presença da fração FHex de *P. umbellata*. Na literatura dados sobre proteínas com peso molecular entre 41 e 44 kDa, descrevem uma subtilisina de 41 kDa relatada por Giddey et al. (2007) e uma proteinase de 44 kDa descrita por Asahi et al. (1985). Ainda Giddey et al. (2007) cita uma metaloprotease de 17 kDa. A diminuição da expressão de uma proteinase pode influenciar na infecção fúngica, pois estas enzimas são necessárias para a degradação de substratos proteicos durante a infecção. Frente a voriconazol, observamos em nossos resultados a diminuição da expressão de proteínas de 33 kDa.

Os resultados dos experimentos de zimografia em gel com gelatina demonstraram a ação de enzimas proteolíticas. Na linhagem Tr1 observou-se a uma maior ação proteolítica na condição controle em relação a condição de

tratamento com a fração FHex do extrato de *P. umbellata*. Este resultado está condizente com o observado nos experimentos de eletroforese bidimensional. Na linhagem Mc, observou-se uma maior ação proteolítica na condição de tratamento com a fração FHex em relação a condição controle.

Os resultados referentes à germinação de esporos, demonstraram ação da fração FHex sobre o fungo com a inibição da germinação de esporos a partir da concentração 19,53 µg/mL para linhagem Tr1 e menores que esta concentração para a linhagem TrFOC, demonstrando correlação com os resultados de CIM que foram de 9,76 µg/mL para as duas linhagens. Esta inibição impede o desenvolvimento fúngico, vários fatores podem estar relacionados a esta ação como inibição da síntese de proteínas, enzimas ou substâncias estruturais relacionadas à parede fúngica.

Nossos experimentos relacionados ao crescimento de hifas demonstram modificações na estrutura das hifas quando tratadas com a fração FHex, com aumento no aparecimento de hifas laterais em função do tratamento. A capacidade de orientação do eixo de crescimento de hifas é um aspecto essencial da fisiologia das células fúngicas (BRAND e GOW, 2009).

Nosso estudo sugere que a fração FHex de *P. umbellata* além de atuar na expressão de diferentes proteínas associadas aos processos de infecção e captação de nutrientes essenciais aos processos de sobrevivência, também tem atuação sobre a síntese de parede e/ou rotas bioquímicas associadas a os processos fisiológicos de desenvolvimento do fungo.

Os efeitos citotóxicos das drogas antifúngicas podem estar relacionados com a interrupção de vias biossintéticas vitais ao fungo. O estudo de proteínas expressas pelo fungo pode levar a compreensão da resposta deste frente a estímulos externos como por exemplo tratamentos antifúngicos, podendo auxiliar como ferramenta no entendimento de possíveis mecanismos de ação ou na descoberta de novos alvos.



## 7. Conclusão

Pelos resultados avaliados podemos concluir que:

- As frações de *P. umbellata* tem potencialidade antifúngica.
- Observou-se ação antifúngica em várias frações de *P. umbellata* com diferentes padrões cromatográficos, como FRes e FInt 78,12 µg/mL, FAc 39,06-312,5 µg/mL.
- A FHex apresentou melhor ação antifúngica (CIM 9,76 µg/mL) e também demonstrou citotoxicidade “*in vitro*” (IC<sub>50</sub> 40,05 µg/mL) e “*in vivo*”
- Várias frações demonstraram ser citotóxicas “*in vitro*”, como FRes IC<sub>50</sub> 106,65 µg/mL e FAc IC<sub>50</sub> 31,77 µg/mL.
- Os constituintes do óleo essencial encontrados na amostra analisada estão de acordo com dados da literatura.
- A fração FHex diminui a quantidade de ergosterol presente no fungo
- Demonstrou-se diferenças na expressão proteica quando na condição de tratamento, necessitando analisar as proteínas que diferencialmente expressas.
- Relação das proteínas expressas pelo fungo sugerem com o mecanismo de ação de drogas antifúngicas e extratos vegetais

## 8. Referências Bibliográficas

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gaschromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. J. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay **Immunol. Methods**, v.170, p.211-224. 1994.

ALMEIDA, S. R. **Micologia**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008.

ALVAREZ, F. J. ; DOUGLAS, L. M. ; KONOPKA, J. B. Sterol-Rich plasma membrane domains in fungi. **Eukaryotic Cell**,v.6, n.5, p.755-763, 2007.

AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**., v. 28, p.197–201, 2010

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A. FRADE,J. P.; BRANDT, M. E.; HAJJEH, R. A.; HARRISON, L. H.; SOFAIR, A. N.; WARNOCK, D. W.**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.,v. 46, n. 8, p. 2477-2481, 2002.

ASHAI, M.; LINDQUIST, R.; FUKUYAMA,K.; APODACA,G.; EPSTEIN, W. L.; MCKERROW, J. H. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. **Biochem.J.**, v. 232, p.139-144, 1985.

APODACA,G ; MCKERROW.J.H. Purification and characterization of a 27,000-M<sub>r</sub>extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*.**Infection and Immunity**, v.57, p. 3072-3080, 1989.

AQUINO, V.R.;CONSTANTE, C.C.; BAKOS, L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. **An Bras Dermatol.** , v.82, n.3, p.239-44,2007.

BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *piper umbellata* (piperaceae). **Quim. Nova**,v. 32, n.5, p.1107-1109, 2009.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from indian medicinal plants against human pathogenic *aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences.**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M.Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba).**Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 41, n. 1, 2005.

BÉRGAMO, D.C.B. **Avaliação química dos compostos não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcatecol em Pothomorphe umbellata.** 2003. 146f. Tese (Doutorado em Química Organica)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BEHZADI, E.; BEHZADI, P.; SIRMATEL, F. Identification of 30-kDa heat shock protein gene in *Trichophyton rubrum*.**Mycoses.**,v. 52, 3, p.234–238, 2008.

BRAND, A.; GOW, N. A. R.; Mechanisms of hypha orientation of fungi.**Curr Opin Microbiol.**, v. 12,n. 4, p.350–357,2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência. Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010:** rename 2010. 2. ed. Brasília, 2010. 1135p.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GUGLIETTA, A.; PALACIN, C.; CASALS, J.; DEL VALLE, O.; GUARDIA, C.; RODRIGUEZ, V.; QUINDÓS, G. In vitro antifungal

active of sertaconazole compared with nine other drugs against 250 clinical isolates of dermatophytes and *scopulariopsis brevicaulis*. **Chemotherapy**, v. 50, p. 308-313, 2004.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRAS, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioterap**, v. 19 n.2, p.130-139, 2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S.; **Fundamentos de cromatografia**. Campinas. Ed. Unicamp, 2006.

COSTA, A.F. Farmagnosia. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1994. 2v

CACZYK, K.; TROJANOWSKA, K.; STACHOWIAK, B. Inhibition of ergosterol biosynthesis in fungal plant pathogens by *Bacillus* sp. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 11, n. 5, p.593-597, 2002.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, Z.M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, 39–44, 2003.

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN BERGH, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G.J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 155–165, 2005.

DENNING, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 889-891, 2002.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

- DRAKENSJÖ, I. T., CHRYSANTHOU, E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. **Medical Mycology**, v. 49, p.484–488, 2011.
- EISENKOLB, M.; ZENZMAIER, C.; LEITNER, E.; SCHNEITER, R. A Specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. **Molecular Biology of the Cell.**, v. 13, p.4414-4428, 2002.
- FACHIN, A. L.; CONTELE, E. P. B.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. **Medical Mycology**, v.39, p.129-133, 2001.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FRAVE, B.; RYDER, N. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and Its Inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40 (3), p. 443–447. 1996.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12 (4), p. 501–517, 1999.
- GIDDEY, K.; MONOD, M.; BARBLAN, J.; POTTS, A.; WARIDEL, P.; ZAUGG, C.; QUADRONI, M. Comprehensive analysis of proteins secreted by *trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under in vitro conditions. **Journal of Proteome Research**, v.6, p.3081-3092, 2007.
- GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, p. 138-149, 2006.
- GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GROTHAUS, P. G.; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v.14, p.1781-1791, 2010.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p.19-20, 2008.

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v.51, p.2–15, supl.4, 2008

ISOBE, T.; OSAKI, A.; NAGATA, K.; Antibacterial constituents against *helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v.122, n. 4, p.291-294, 2002

JANUÁRIO, V.A., **Estudo químico e farmacológico de *Pothomorphe umbellata*(L.) Miq.** 1994. f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

JESSUP, C.J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I.; GHANNOUM, M.A.; Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p. 341-344, 2000.

KÖHLER, G.A.; BRENOT, A.; HAAS-STAPLETON, E.; AGABIAN, N.; DEVA, R.; NIGAM, S. Phospholipase A2 and Phospholipase B activities in fungi. **Biochim Biophys Acta.**, v.1761, n.11, p.1391-1399, 2006.

KOROISHI, A. M. FOSS, S. R.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology** v.117, p.270–277, 2008.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. São Paulo. Sarvier. 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v 227, p. 680-685, 1970.

LEE, H. K.; PARK, K. K.; PARK, S. H.; LEE, J. B. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporum canis*. **Yonsei Medical Journal**. ,v. 28, n.2, p. 131-8,1987.

LEMOS, J.A.; PASSOS, X.S.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, J.R.; FERRI, P.H.; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, A.A.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity from *ocimum gratissimum* L. Towards *Cryptococcus neoformans*. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.1, p. 55-58, 2005

LENG, W.; LIU, T.; LI, R.; YANG, J.; WEI, C.; ZHANG, W.; WEI, Q. Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia. **BMC Genomics**, v.9,303, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas**. Nova Odessa. Plantarum, p. 512., 2002

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**., v.166, p.369–383, 2008.

MARTINS, A. P. SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CAÑIGUERAL, S.; CASANOVA, J.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ADZET, T. Essential oils from four piper species. **Phytochemistry**. v. 49, n. 7, p. 2019-2023, 1998

MATTANA, R.S.; **Produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial e plasticidade foliar em plantas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento**. 2005. f Dissertação (Mestrado em Agronomia Horticultura) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MESQUITA, J. M.O.; CAVALEIRO,C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae **Revista Brasileira deFarmacognosia**,v. 15, 1,p. 6-12, 2005.

MIGNON, B.; SWINNEN, M.; BOUCHARA, J.P.; HOFINGER, M.; NIKKELS, A.; PIERARD, G.; GERDAY, C.H.; LOSSON, B. Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from and evidence of its secretion in naturally infected cats. **Medical Mycology**., v 36, n.6, p. 395–404, 1998.

MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes.**Mycopathologia**. v.166, p.285–294, 2008

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro. Elsevier, 2009. 948p.

NCBI PubChem Substance, disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>  
Acesso: 24 de setembro 2012

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos**. Norma Aprovada. NCCLS document M38-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.(ISBN 1-56238-470-8).

NEVES, R. C. S. M.; CRUZ, F. A. C. S.; LIMA, S. R.; TORRES, M. M.; DUTRA, V.; SOUSA, V. R. F. Retrospectiva das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, nos anos de 2006 a 2008.**Ciência Rural**. v.41, n.8, p. 1405-1410, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010.**J. Nat. Prod.**, v.75,p. 311–335, 2012.



O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; ODDS, F.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews.**, v. 9, p. 719-727, 2010.

PALUMBO, M. I. P.; MACHADO, L. H. A.; PAES, A. C.; MANGIA, S. H.; MOTTA, R. G. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu. **Semina: Ciências Agrárias.** v. 31, n. 2, p. 459-468, 2010.

PERAZZO, F.F., SOUZA, G.H.B., LOPES, W., CARDOSO, L.G.V., CARVALHO, J.C.T., NANAYAKKARA, N.P.D., BASTOS, J.K., Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethopharmacology**, vol.99(2), p.215-220, 2005

PERAZZO, F.F.; Tese de doutorado FCFRP – USP Ribeirão Preto, Brasil, 2006.

PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An Bras Dermatol**;85(5):657-67.2010.

PINTO, A. C. S.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.C; MORAES, M.O.M.; MORAES, M.E.; CAVALCANTI, B.C.; NUNOMURA, S. N.; POHLIT, A.M. *In vitro* cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (Piperaceae), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.esp., p.205-211, 2006.

REZENDE, C.; BORSARI, G. P.; SILVA, A. C. F.; CAVALCANTI, F. R. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. **RBAC**, vol. 40(1): 13-16, 2008.

RODRIGUES, E.R. Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* e drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão protéica. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Biotecnologia de Plantas Medicinais e Micro-organismos) UNAERP, Brasil, 2007

ROERSCH, C. M. F. B.; *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**. 131 522–537,2010.

RYDER, N.S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal of Dermatology**.126 Suppl 39:2-7. 1992

SACOMAN, J.L.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G.M.;FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*.**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 41: 411-415. 2008.

SANTOS, K. K.A.; MATIAS, E.F.F.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais e Animais da Região do Cariri. *Cadernos de Cultura e Ciência*. Ano IV - Vol. 1- Nº 2 2010

SANYAL, A. K.; DAS, S. K. ;BANERJEE, A. B. Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum*.*Sabouraudia*: **Journal of Medical and Veterinary Mycology** 23, 165-178, 1985

SCHOELER, A. P.; SGUISSARDI, C. H.; BEMARDI, E.; CEMBRANEL, L. R.; FUENTEFRIA, A. M. Prevalência de dermatófitos na rotina de micologia em

hospital particular de médio porte na cidade de Chapecó, estado de Santa Catarina, Brasil. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**;31(1):103-106, 2010

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B: Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. **Mycopathologia**. 166:335–352.2008

SIMPANYA, M.F. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. In: KUSHWAHA, R.K.S, GUARRO, J. (Ed.). **Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi**. Bilbao, 2000.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. 1369 p.

SPONCHIADO-JUNIOR, E. C. **Atividade antibacteriana contra o Enterococcus faecalis de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata***. 2006. 136f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, 2006.

SUMMERBELL, R. C., WEITZMAN, I., PADHYE, A. A. *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, and Agents of Superficial Mycoses*. In MURRAY, P. R. (Ed). **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington, D.C.: ASM Press, p.1874-1897. 2007.p.1874-1897,v.2.

TABOPTA, T.K. NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.C; TANOLI, S.A.K; KHAN, S.N.K.; ALI, M.S.; NGADJUI, B.T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, v.69, p.1726–1731, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSUBOI, R. KO, I.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation of a Keratolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect Immun.**, v. 57, n. 11, p. 3479-83, 1989 a.

TSUBOI, R.; MATSUDA, K.; KO, I. J.; OGAWA, H. Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity, and cell growth of *Candida albicans* in insoluble stratum corneum-supplemented media. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 281, n. 5, p. 342-345, 1989 b.

VALADARES, M. C.; Rezende, K. R.; Pereira, E.R.; Sousa, M. C.; Gonçalves, B.; de Assis, J. C.; Kato, M. J. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food and Chemical Toxicology** v.45, n. 10, p.1975–1978, 2007.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 26, 2012.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, p.171-179, 2000.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant drug analysis. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WANG, L.; MA, L.; LENG, W.; LIU, T.; YU, L.; YANG, J.; YANG, L.; ZHANG, W.; ZHANG, Q.; DONG, J.; XUE, Y.; ZHU, Y.; XU, X.; WAN, Z.; DING, G.; YU, F.; TU, K.; LI, Y.; LI, R.; SHEN, Y.; JIN, Q. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC Genomics**. v.7, p.255, 2006.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clin Microbiol Rev.**, v. 8, n. , p. 240-259, 1995.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 11 , n. 2 , p. 382–402, 1998.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica de química medicinal moderna.** Chapecó, SC: Ed. Argos, 2001

ZAUGG, C; JOUSSON, O.; LE´CHENNE, B.; STAIB, P.; MONOD, M. *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. **International Journal of Medical Microbiology.** v.298,n. , p.669–682, 2008.

ZHANG, Y, Q; RAO, R. Beyond ergosterol linking pH to antifungal mechanisms. **Virulence**, v.1, n.6, p.551-554, 2010

## Anexos

### 1. Reagentes para eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

#### 1.1. Solução de Acrilamida bis-acrilamida

Acrilamida 30%	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	100,0 mL

Foi adicionada a água sobre a acrilamida e mantida a solução a 56°C coberta com Parafilm até a dissolução completa. A solução foi filtrada e estocada em frasco escuro.

#### 1.2. Tampão tris HCl pH 8,8

Trizma base 1,5 M (pH 8,8)	18,17 g
SDS 20%	2,00 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	100,00 mL

Foram adicionados 50 mL de água e acertado o pH para 8,8 com HCl 6N. Foi acrescentado o SDS, completado o volume e filtrada a solução que foi armazenada sob refrigeração.

#### 1.3. Tampão tris HCl pH 6,8

Trizma base 1,0 M (pH 6,8)	6,06 g
SDS 20%	2,00 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada	100,00 mL

Foram adicionados 50 mL de água e acertado o pH para 6,8. Foi acrescentado o SDS, completado o volume e filtrado. A solução foi Guardada sob refrigeração.

#### 1.4. Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

SDS 10%	
SDS	10,0 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	100,0 mL

O SDS foi dissolvido em água e armazenado geladeira

### 1.5. Solução de Persulfato de Amônio (APS)

Persulfato de Amônio	0,5 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	5,0 mL

Foram misturados até dissolução e distribuídos em alíquotas que foram mantidas congeladas a -20°C.

### 1.6. Tampão de corrida pH 8,3

Trizma 25 mM	3,06g
Glicina 192 mM	14,4 g
SDS	1,0 g
H <sub>2</sub> O destilada qsp	1000,0 mL

Foram dissolvidos Trizma, glicina e SDS em 900 mL de água, ajustado o pH para 8,3 e completado o volume para 1000 mL com água destilada.

### 1.7. Tampão de amostra

Tampão de amostra (concentrado 5 vezes)	10 mL
Trizma 60 mM (pH 6,8)	0,6 ml
Glycerol 25%	2,5 mL
SDS 2%	1,0 mL (a 20%)
2-mercaptoetanol 14,4 mM	0,5 mL
Azul de bromofenol 0,1%	1,0 mL (a 1%)
H <sub>2</sub> O bidestilada	4,4 mL

Foram distribuídos em alíquotas e estocados a -20°C.

## 2. Reagentes para revelação do gel pela prata

### 2.1. TCA (Ácido tricloroacético)

Ácido tricloroacético	10 g
Água Mili Q qsp	100 mL

## **2.2. Solução de lavagem**

Etanol	10 mL
Ácido acético	5 mL
Água Mili Q qsp	100 mL

## **2.3. Solução oxidante**

Ácido cítrico	100 mg
Dicromato de Potássio	67 mg
Água Mili Q	100 mL

## **2.4. Solução Nitrato de Prata**

Nitrato de Prata	200 mg
Água Mili Q	100 mL

## **2.5. Solução redutora**

Carbonato de sódio	2,96 g
Formaldeído	200 µL
Água Mili Q qsp	100 mL

## **2.6. Solução ácido acético**

Ácido Acético	5 mL
Água Mili Q	95 mL

## **3. Reagentes para coloração com Azul de Coomassie**

### **3.1. Corante**

Coomassie G-250	0,1 g
Metanol	10 mL
Ácido acético	5 mL
Água Mili Q	85 mL



### **3.2. Solução de fixação**

Metanol	45 mL
Ácido acético	10 mL
Água Mili Q	45 mL

### **3.3. Descorante**

Metanol	10 mL
Ácido acético	5 mL
Água Mili Q	85 mL

### **3.4. Descorante para zimografia**

Metanol	50 mL
Ácido acético	10 mL
Água Mili Q	40 mL

## **4. Reagentes para a Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

### **4.1. Placa de cromatografia**

Sílica gel, Marca Merck procedência :Alemanha.

Placa 0,25 mm

Indicador de fluorescência UV 254

### **4.2. Solução de hexano e Acetato de etila 7:3**

Hexano	7 mL
Acetato de etila	3 mL

### **4.3. Solução de hexano e Acetato de etila 6:4**

Hexano	6 mL
Acetato de etila	4 mL

### **4.4. Solução de hexano e Acetato de etila 1:1**

Hexano	5 mL
Acetato de etila	5 mL

#### **4.5. Solução butanol-ácido acético e água (BAW)6:1:2**

Butanol	6 mL
Ácido acético	1 mL
Água	2 mL

#### **4.6. Solução reveladora de anisaldeído sulfúrico**

Anisaldeído	2,5 mL
Ácido acético	50 mL
Metanol	425 mL
Ácido sulfúrico	25 mL

Os reagentes foram misturados em cuba com gelo e estocado em frasco âmbar na geladeira.



## Sítio da Mata

### Laudo Técnico

Rodovia Cajuru | Cassia dos Coqueiros | Fone/Fax: (16) 2133.4455  
Nº Inscr. Prod.: 024.308.178

**Produto:** Caapeba - Pó

-CAAPEBA PO

**Nome Científico 1:** Pothomorphe umbellata

**Nome Científico 2:**

**Família:** Piperaceae

**Origem (país):** Sítio da Mata (Cajuru) - Brasil

**Parte Utilizada:** Partes aéreas

#### Características Macro e/ou Microscópicas:

Subarbusto ereto, perene, muito ramificado, com hastas articuladas e providas de nós bem visíveis, de 1,0-2,5 m de altura, folhas amplas, com as bases pregueadas parecendo peltadas, cartáceas, de 15-25cm de comprimento, com pecíolo de 18-24 cm. Flores pequenas e discretas, de cor creme-esverdeada, reunidas em inflorescência axilares espigadas de 4-8 cm de comprimento. Multiplica-se por semente.

#### Referência Bibliog.:

<b>Lote</b>	01SDM	<b>Cor:</b>	Verde
<b>Colheita:</b>	06/01/2009	<b>Validade:</b>	06/01/2012
<b>Descontaminação:</b>	Congelamento por 10 dias		
<b>Mét. de Secagem:</b>	À sombra		
<b>Umidade:</b>	7%		
<b>Odor e Sabor:</b>	Característico da Planta		
<b>Obs.:</b>	Por se tratar de insumo de origem vegetal, poderão ocorrer leves variações em sua cor, odor e sabor.		

**Responsável**

Ademar Meneses Jr.

Ademar Meneses Junior - CREA: 5060000803

Eng. Agrônomo - (16) 2133.4455



Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 29/2011

Pesquisador: EDVÂNIO RAMOS RODRIGUES

Orientador: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Projeto: Avaliação das atividade de *Pothomorphe umbellata* frente a linhagens de *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*.


Experimento: Determinação da toxicidade oral aguda do extrato etanólico de *Pothomorphe umbellata* em camundongos.

#### Parecer nº 11/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Avaliação das atividade de *Pothomorphe umbellata* frente a linhagens de *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*", apresentado pelo pós-graduando Edvânio Ramos Rodrigues sob orientação da Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em novembro de 2012, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 18 de abril de 2012.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 30/2011

Pesquisador: EDVÂNIO RAMOS RODRIGUES

Orientador: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Projeto: Avaliação da atividade de *Pothomorphe umbellata* frente a linhagens de *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*

Experimento: Análise da motilidade intestinal do extrato etanólico de *Pothomorphe umbellata* em camundongos

#### Despacho nº 02/2012 - Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais verificou que o protocolo para uso de animais no projeto de pesquisa "Avaliação da atividade de *Pothomorphe umbellata* frente a linhagens de *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*" necessita de adequações/esclarecimentos nos seguintes aspectos:

I – Item 4.4 - Especificar cada grupo experimental proposto no projeto;

II – Item 5.2 – Número de animais/ambiente de contenção: 10 animais por gaiola. Os animais de dois grupos experimentais diferentes serão colocados em um mesmo ambiente de contenção?

III – Item 6.13 – Exposição e/ou inoculação de agentes químicos /físicos /biológicos /mecânicos: incluir que o extrato etanólico de *P. umbellata* será administrado em dose única.

IV – Item Termo de Responsabilidade: incluir o título do experimento.

Solicita-se, ainda, que a resposta a este despacho seja enviada em forma de carta/ofício de forma ordenada, conforme os itens constantes deste despacho, com os esclarecimentos ou indicações das possíveis alterações efetuadas no novo protocolo preenchido. O projeto em questão terá prazo de até 30 dias para sua adequação, após o que o processo de análise será arquivado, conforme letra c do Art. 21 do Regimento desta CEUA.

Araraquara, 01 de março de 2012.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA