



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação da atividade antifúngica de extratos de
Plinia cauliflora e *Endopleura uchi*.**

Mayara Ivani de Paula

ARARAQUARA – SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Plinia cauliflora* e *Endopleura uchi*.

Mayara Ivani de Paula

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia e Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

ARARAQUARA – SP

2011

Agradecimentos

A Deus, por tornar possível a conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais, Fernando e Rosana, pela educação e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Gustavo e Stéfano, pela companhia e por tudo que passamos juntos.

Aos professores que passaram por minha vida, em especial a Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro pela orientação exemplar, sempre disposta a colaborar, com empenho incansável e exemplo de profissionalismo.

A Rodrigo Sorrechia, técnico do laboratório, que foi um grande amigo no período em que realizei todos os meus experimentos.

A Tatiana Souza, pelos ensinamentos práticos e teóricos e pelo tempo que passamos juntas.

A Paulo Boldrin, pela ajuda, pela paciência e pelo tempo que passamos juntos.

A Edvânio Rodrigues, pelo esclarecimento de várias dúvidas e também pelo carinho e pela paciência.

Sumário

Resumo

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. Introdução.....	11
2. Desenvolvimento.....	14
2.1 Objetivos.....	14
2.2 Material e Métodos.....	14
2.2.1 Material.....	14
2.2.1.1 Solventes, Reagentes e Meios de Cultura.....	14
2.2.1.2 Equipamentos e Utensílios.....	15
2.2.1.3 Material vegetal.....	15
2.2.1.3.1 Cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i>	16
2.2.1.3.2 Folhas de <i>Plinia cauliflora</i>	16
2.2.1.4 Cepas padrão.....	16
2.2.2 Metodologia.....	17
2.2.2.1 Obtenção do extrato e de suas frações.....	18
2.2.2.2 Preparo dos extratos e das frações.....	18
2.2.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima.....	19
2.2.2.4 Avaliação do crescimento radial das colônias dos fungos.....	21
3. Resultados.....	22
4. Discussão.....	37
5. Conclusão.....	42
6. Referências Bibliográficas.....	44

Resumo

O uso indiscriminado dos medicamentos sintéticos e a própria evolução dos micro-organismos selecionou espécies extremamente resistentes aos agentes químicos utilizados. Para contornar tal situação e ampliar o arsenal de compostos ativos contra micro-organismos, o estudo de plantas tornou-se uma necessidade crescente. A utilização de fitoterápicos na prevenção e/ou cura de doenças são necessários estudos prévios relativos a aspectos botânicos, farmacognósticos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Neste trabalho, foram estudados extratos obtidos com as folhas de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec., quanto às propriedades antimicrobianas frente a diferentes linhagens de fungos: *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma reesei* e *Trichophyton rubrum*. Foram avaliadas as atividades antifúngicas dos materiais vegetais determinando sua Concentração Inibitória Mínima (CIM). Com base nesses dados foi realizada a avaliação da atividade antifúngica observando o crescimento radial dos fungos em placas de Petri contendo meio de cultura incorporado com os materiais vegetais nas concentrações de CIM e 1%, sendo após realizada a mensuração dos diâmetros formados. *Trichophyton rubrum* foi o micro-organismo que apresentou maior sensibilidade frente ao extrato e as frações de *P. cauliflora*, com valores de CIM baixos, enquanto que a cepa industrial de *Aspergillus niger* mostrou-se totalmente resistente a todos os extratos testados.

A determinação da atividade antifúngica em placas contendo meio sólido, mostrou uma confirmação dos resultados pois o extrato etanólico, a fração butanólica e a fração aquosa de *P. cauliflora*, tanto na concentração 1% quanto na obtida pelo CIM, inibiram o crescimento *T. rubrum*.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima.....	21
Figura 2: Colônias de <i>B. bassiana</i> frente ao extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> e controle de crescimento.....	25
Figura 3: Formação das colônias de <i>T.reesei</i> frente ao extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> e controle de crescimento.....	26
Figura 4: Diâmetro das colônias dos fungos quando em contato com o extrato etanólico de <i>P. cauliflora</i>	26
Figura 5: Colônias de <i>T. rubrum</i> frente a fração butanólica de <i>P. cauliflora</i>	28
Figura 6: Diâmetro das colônias dos fungos frente a fração butanólica de <i>P. cauliflora</i> nas concentrações testadas (1% e CIM) e do controle de crescimento.....	29
Figura 7: Colônias de <i>B. bassiana</i> em contato com a fração acetato de etila de <i>P.cauliflora</i>	31
Figura 8: Colônias de <i>M. anisopliae</i> em contato com a fração acetato de etila de <i>P.cauliflora</i>	31
Figura 9: Diâmetro das colônias dos fungos frente a fração acetato de etila de <i>P. cauliflora</i> nas concentrações testadas (1% e CIM) e do controle de crescimento.....	32
Figura 10: Colônias de <i>B. bassiana</i> frente a fração aquosa de <i>P. cauliflora</i>	34
Figura 11: Diâmetro das colônias dos fungos frente a fração aquosa de <i>P. cauliflora</i> nas concentrações testadas (1% e CIM) e do controle de crescimento.....	34

Figura 12: Colônias de *A. niger* em meio PDA(A) e colônias de *A. niger* em meio PDA incorporado com extrato etanólico de *P. cauliflora* na concentração 1%(B).....35

Figura 13: Fotomicrografia da análise microscópica da morfologia de *A. niger* em meio PDA(A), Fotomicrografia da análise microscópica das colônias de *A. niger* em meio PDA incorporado com extrato etanólico de *P. cauliflora* (B)e Fotomicrografia do repique subsequente em meio PDA(C).....36

Lista de Tabelas

Tabela 1: Cepas de fungos utilizados no trabalho.....	17
Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) de extrato de <i>P. cauliflora</i> (extrato etanólico), frações (butanólica, aquosa e acetato de etila) e de dois extratos de <i>E. uchi</i>	23
Tabela 3: Diâmetro das colônias dos fungos frente ao extrato etanólico das folhas de <i>P. cauliflora</i>	24
Tabela 4: Diâmetro das colônias dos fungos em contato com a fração butanólica de <i>Plinia cauliflora</i>	27
Tabela 5: Diâmetro das colônias dos fungos quando em contato com a fração acetato de etila de <i>Plinia cauliflora</i>	30
Tabela 6: Diâmetro das colônias dos fungos quando em contato com a fração aquosa de <i>Plinia cauliflora</i>	33
Tabela 7: Diâmetro das colônias de <i>T. rubrum</i> quando em contato com o extrato e as frações de <i>Plinia cauliflora</i>	36

Lista de Siglas e Abreviaturas

ATCC: American Type Culture Collection

BM: Banho-maria

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetilsulfóxido

ETOH 50%: Etanol 50%

Extrato EtOH: Extrato Etanólico

FOC: Fundação Oswaldo Cruz

FrAcOEt: Fração Acetato de Etila

FrAq: Fração aquosa

FrBUOH: Fração Butanólica

PDA: Potato Dextrose Ágar

UV: Ultra-violeta

1.INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamentos parece ser tão antiga quanto a própria humanidade. As plantas por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas adquiriram fundamental importância na medicina popular (MARTINS et al., 1998). A humanidade acumulou durante os anos, um acervo de informações sobre o ambiente que a cerca (BRITO et al., 1996), e os produtos naturais usados por séculos seguem orientando muitos caminhos da medicina moderna (YUNES e CALIXTO, 2001).

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças, apresenta fundamentalmente, influência da cultura indígena, africana e, naturalmente da européia (MARTINS et al., 1998). Observações populares sobre a utilização e a eficácia de plantas medicinais contribuem de modo significativo para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais. Estes são prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitos não terem seus constituintes químicos e suas propriedades tóxicas estudadas (MACIEL et al., 2002).

Diversos pesquisadores têm desenvolvido, com êxito, muitas linhas de pesquisas baseadas nas propriedades anti-infecciosas e antiinflamatórias de muitas plantas de utilização na medicina popular as quais poderão contribuir na terapêutica antimicrobiana (HOLETZ et al., 2002; ZACCHINO et al., 2001). Ao lado dessas pesquisas, muitos estudos sobre plantas buscam outras propriedades e dentro destas linhas de pesquisa estão os estudos de MERTZ et al que analisou o efeito dos produtos fitosanitários naturais sobre *Beauveria bassiana in vitro* e a *Curcuma longa* foi compatível ao fungo na menor concentração enquanto que o capim limão (*Cymbopogon citratus*) e citronela

(*Cymbopogon nardus*), não afetaram a virulência do fungo. Ainda podemos relatar os estudos de REDDY et al(2003) que estudaram o efeito inibitório de homoisoflavonóides de *Caesalpinia sappan* contra *B. bassiana*.

Aproximadamente 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal e 50% são de origem sintética, embora estejam relacionados aos princípios ativos de plantas medicinais. Isto se deve, em parte, à grande variedade de espécies de plantas existente na flora mundial, algumas com importantes propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Os metabólitos secundários são produtos que, embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema. Já foram reconhecidas como funções desses metabólitos a defesa contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra os raios ultravioleta, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990) e em alelopatias (HARBORNE, 1988; SANTOS, 2004). O grande poder antimicrobiano contra bactérias e fungos patogênicos para o homem exibido pelos vegetais superiores, especialmente pelos metabólitos secundários, tem sido verificado usando técnicas microbiológicas modernas (MITSCHER et al., 1987; DARWISH et al., 2002).

Os estudos demonstrados na literatura relatam que a atividade antimicrobiana apresentada por algumas espécies vegetais deve-se a diferentes mecanismos pelos quais atuam seus compostos ativos, e que muitas vezes, existe mais de um composto ativo produzido pela planta, o que contribui para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana (BARBOUR et al., 2004).

Alguns trabalhos têm demonstrado que extratos das folhas de *Plinia cauliflora* apresentam propriedades antioxidante, antibacteriana e antifúngica (SOUZA, 2007; SOUZA-MOREIRA, et al.2010; OLIVEIRA, 2001). Essa espécie é nativa e muito utilizada no Brasil, apresentando ampla disponibilidade e fácil acesso. O trabalho de Souza (2007) indicou que extrato hidroalcoólico das folhas de *P. cauliflora* possui teor de fenóis totais superior a 40%, com predominância de flavonóides e taninos.

Endopleura uchi é uma espécie originária da Amazônia brasileira encontrada em estado silvestre em mata de terra firme. O fruto é considerado um alimento de grande importância para muitas comunidades rurais. A casca é amplamente comercializada em feiras, mercados e até mesmo farmácias, sendo utilizada na forma de maceração ou chá, para o tratamento de artrite, colesterol, diabetes e como antiinflamatório (CORRÊA, 1984).

POLITI et al (2011) demonstraram que os extratos etanólicos e aquosos de *E. uchi* não possuem atividade antimicrobiana frente a cinco bactérias e uma levedura. Esses extratos demonstraram alto teor de substâncias com propriedades antioxidantes e ausência de citotoxicidade.

Segundo a literatura (WHITE et al., 1998), o objetivo de qualquer agente antimicrobiano é erradicar o organismo causador de infecção sem causar efeito nocivo ao hospedeiro, devendo apresentar grande seletividade sobre o patógeno e ser essencial para o crescimento ou viabilidade do invasor.

Embora a ação dos agentes antifúngicos esteja elucidada (WHITE et al., 1998), pouco se sabe sobre o alvo de novos agentes, principalmente quando advindos de fontes naturais como as plantas. Portanto é de interesse estudos

que avaliem novas coleções de moléculas representadas por extratos vegetais e que apresentem tais atividades.

Extratos vegetais podem atuar de diferentes maneiras contra diferentes fungos, como por exemplo fungos patogênicos como *T. rubrum* e fungos entomopatogênicos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, ou fungos utilizados na Biotecnologia como *T. reesei* e *A. niger*.

2. Desenvolvimento

2.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato e das frações de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e dos extratos de *Endopleura uchi*, contra as diferentes linhagens de fungos, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Metharhizium anisopliae*, *Trichodema reesei* e *Trichophyton rubrum*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material

2.2.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

- Acetato de etila – Labsynth
- Água destilada
- Anfotericina B – Sigma
- D-glicose anidra – Labsynth
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Labsynth
- Etanol – Labsynth
- Hidróxido de sódio – Labsynth

- Meio ágar Sabouraud – Acumedia
- Meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich
- Meio PDA – Potato Dextrose Agar – Acumedia

2.2.1.2 Equipamentos e utensílios

- Agitador – Superohm G-25
- Autoclave vertical – Fabbe 103
- Balança analítica – Micronal AB 204
- Balança semi-analítica – Owa Labor
- Banho de aquecimento – Fisatom
- Bomba a vácuo – Motores Elétricos Brasil
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Câmara de Neubauer - Boeco
- Estufa de ar circulante – Fanem
- Microscópio – Carl ZeissJena
- Microscópio Óptico – Olympus CH20
- Paquímetro digital – Starrett
- Peagâmetro – Micronal B374
- Pipetadores automáticos de volumes variados – Gilson
- Placas de 96-wells – TPP 92096
- Vidrarias e porcelanas em geral
- Vórtex – BiomixerMult-Mixer MVS-1

2.2.1.3 Material vegetal

2.2.1.3.1. Cascas pulverizadas de *E. uchi*

Cascas finamente pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) (Humiriaceae), fornecidas pela empresa Sítio da Mata (lote: Uxi03/01; N°Inscr. Prod.: 024.308.176; colheita: 01/09/2005; validade: 30/09/2008), localizada na Rodovia Cajuru, Cássia dos Coqueiros (SP), Brasil, utilizadas para todos os testes de atividade antifúngica.

2.2.1.3.2. Folhas de *Plinia cauliflora*

As folhas de *Plinia cauliflora* foram coletadas na cidade de São Carlos, estado de São Paulo (22°01'16.6"S; 47°53'57.0"W). Exsiccatas desta espécie foram identificadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara (SP), e um exemplar foi depositado no Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ – USP – Piracicaba, SP (ESA n° 96038). As folhas foram secas durante quatro dias em estufa de ar circulante a 40 °C, pulverizadas em moinho de facas e armazenadas em local fresco sem umidade para que a partir deste material fossem preparados o extrato e as frações para estudo e microbiológico.

2.2.1.4 Cepas padrão

Os micro-organismos selecionados para o trabalho, obtidos do *American Type Culture Collection* (ATCC) e Fundação Oswaldo Cruz (FOC), são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Cepas de fungos utilizados no trabalho

Micro-organismo	Origem
<i>Beauveria bassiana</i>	ATCC 9372
<i>Trichoderma reesei</i>	ATCC 25923
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 27853
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ATCC374
<i>Trichophyton rubrum</i>	FOC

2.2.2 Metodologia

2.2.2.1 Obtenção do extrato e de suas frações

O extrato das folhas de *P. cauliflora* foi obtido por percolação a partir de 50,00 g da droga seca e pulverizada segundo o Processo Geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1926), utilizando etanol 70% (EtOH 70) como solvente extrator. Posteriormente, o solvente orgânico foi rotaevaporado, e após isso a água do solvente EtOH 70 foi retirada por liofilização, obtendo-se o extrato seco das folhas (extrato EtOH), que foi pesado e armazenado em dessecador para evitar que incorporasse umidade.

Para a obtenção das frações, foram utilizados 15,00 g do extrato vegetal e a água, o acetato de etila e o n-butanol foram usados como solventes do processo de partição líquido-líquido para preparar três frações com

diferentes polaridades, isto é, a fração n- Butanol (FrBuOH), a fração acetato de etila (FrAcOEt) e a fração aquosa (FrAq).

Os extratos de *E. uchi* foram obtidos por percolação e também por decocção, ambos, seguindo o Processo Geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1959. Na obtenção do extrato por percolação (P10) foi utilizado como solvente extrator etanol 50% (EtOH 50%) sendo utilizados 50 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente. Após rotaevaporação, o fim da secagem foi realizado em capela, à temperatura ambiente, até que atingisse massa constante. O extrato obtido foi pesado e armazenado em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

Para a obtenção do extrato por decocção (D10) foram utilizados 50g de casca pulverizada de *E. uchi* para 500 mL de água destilada. Aqueceu-se por 15 minutos. As soluções foram filtradas e então liofilizadas. O extrato obtido foi pesado e armazenado em dessecador.

2.2.2.2 Preparo dos Extratos e das Frações

2.2.2.2.1 Preparo dos antimicrobianos

A Anfotericina B foi o antifúngico utilizado como controle para as cepas de fungos usadas neste trabalho. Foram dissolvidos 16 mg de anfotericina B em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) sendo diluídos, posteriormente, duas vezes na proporção 1:5 em meio RPMI-1640, de forma que a concentração da solução de estoque fosse 32 µg/mL.

2.2.2.2.2 Solução estoque de extratos e frações

Para o teste de determinação da concentração inibitória mínima, foram ressuspensos 100 mg do extrato etanólico e das frações de *P. cauliflora* assim como os dois extratos de *E. uchi* em 1 mL de DMSO. A partir destas soluções, foram feitas as diluições na proporção 1: 10 em meio RPMI-1640 para cada um dos extratos e frações.

Para a realização do teste de avaliação do crescimento radial das colônias dos fungos frente aos extratos vegetais, os extratos e a frações de *P. cauliflora* foram dissolvidos em 200 µL de DMSO para serem incorporados ao meio de cultura.

2.2.2.2.3 Preparo da suspensão de micro-organismos

Colônias com diâmetro de cerca de 1 mm de cultura de 7 dias a 28 °C foram ressuspensas em 2 mL de solução salina 0,9% esterilizada e, após agitada em vórtex por 5 minutos, esta suspensão foi utilizada para obtenção de suspensão de turvação na escala $5 \cdot 10^3$ cels/mL em salina.

2.2.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

Para determinação da concentração inibitória mínima foi utilizada adaptação da metodologia segundo o CLSI M38-A (NCCLS, 2002). Para tanto nesta técnica também foram utilizadas microplacas de 96 poços, que contém 8 linhas e 12 colunas. O meio de cultura utilizado foi o meio RPMI 1640 com 2% de glicose tamponado em MOPS pH 7,2 . A coluna 1 foi usada para o controle negativo do teste onde estava apenas o meio de cultura (200 µL). Na coluna 11

foram colocados 100 µL do meio e 100 µL do extrato a ser testado, servindo de controle negativo do extrato e também para controle de turbidez. A coluna 12 foi considerada como controle positivo onde foram inoculados apenas 100 µL da suspensão de células ($5,0 \times 10^3$ UFC/mL) e 100 µL do meio. Em cada poço nas colunas 2 a 10 foram adicionados 100 µL do meio. Posteriormente na coluna 2 foram colocados 100µL do extrato vegetal, homogeneizado e retirados 100 µL passando para a coluna 3; desta também foram retirados 100µL e repassados a coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 10, onde após a adição dos 100 µL retirados da coluna 9, foram descartados 100µL obtendo-se então a menor diluição do extrato vegetal. Foram colocados 100µL da suspensão de células em concentração $5,0 \times 10^3$ UFC/mL em cada poço nas colunas 2 a 10.

Após a montagem, a placa foi incubada em estufa com agitação de 120 rpm por sete dias a 28° C. A leitura foi feita observando-se o desenvolvimento do microrganismo em relação ao controle negativo, isto é, ausência de crescimento. Foi determinada como CIM o poço com a menor concentração do antifúngico ou extrato onde não ocorreu o desenvolvimento dos microrganismos (Figura 1).

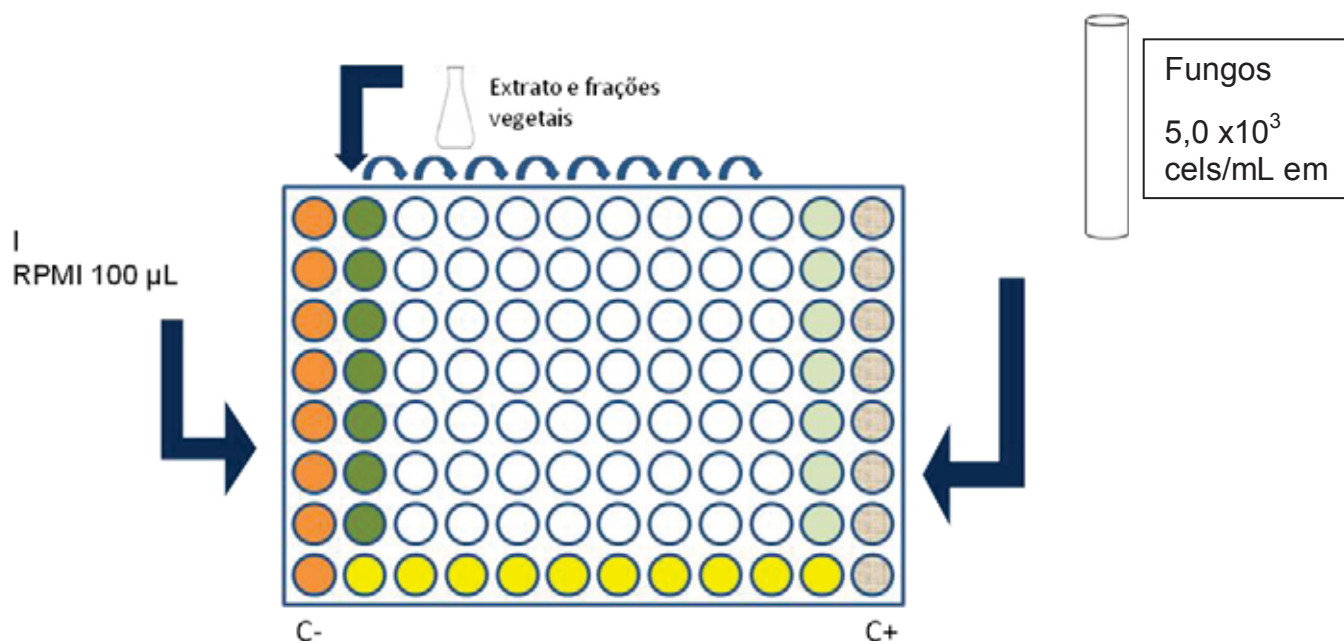


FIGURA 1. Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima

2.2.2.4 Avaliação do crescimento radial das colônias dos fungos frente aos extratos vegetais

Foram realizados ensaios “*in vitro*” utilizando os extratos brutos de *Plinia cauliflora* e de *Endopleura uchi*, na concentração de 1% e na concentração obtida na determinação de CIM. Os extratos e as frações vegetais foram dissolvidos em DMSO, uma vez que foi realizado um controle do crescimento fúngico na presença de DMSO e não foi evidenciada interferência do mesmo no teste. Os materiais vegetais foram acrescentados em ágar PDA fundido (42°C) e foi inoculado com uma pequena amostra do fungo repicado recentemente. Após incubação à temperatura de 28°C por uma semana, foi medido o diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro. Foram feitos

controles do crescimento fúngico que consistiam na ausência do extrato de planta. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3. Resultados

3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A tabela 2 mostra os resultados relacionados aos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) realizados em triplicata. Frente ao *A. niger* não houve inibição pelos extratos em nenhum dos testes realizados impedindo a determinação de CIM. A menor concentração do extrato etanólico de *P. cauliflora* e da fração acetato de etila que inibiu o crescimento de *B. bassiana* foi de 1250µg/mL. A CIM do extrato e frações de *P. cauliflora* frente aos micro-organismos *M. anisopliae* e *T. reesei* foi de 2500 µg/mL. Os extratos de *E. uchi* não apresentaram atividade frente a nenhuma linhagem fúngica e por isso não foram avaliados pela metodologia em placas.

Houve crescimento nos poços selecionados para controle positivo de crescimento enquanto pode ser notada a ausência de crescimento nos poços que não receberam o inóculo, indicando a esterilidade do meio de cultura (controle negativo) e a ausência de contaminação dos extratos.

TABELA 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de extrato de *P. cauliflora* (extrato etanólico), frações (butanólica, aquosa e acetato de etila) e de dois extratos de *E. uchi*

Amostras	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>A. niger</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>T. reesei</i>	<i>T. rubrum</i>
Extrato EtOH	ND	1250	2500	2500	78
de <i>P. cauliflora</i>					
FrBuOH	ND	2500	2500	2500	78
FrAq	ND	2500	2500	2500	78
FrAcOEt	ND	1250	2500	2500	78
Extrato de <i>E. uchi</i> (decoção)	ND	ND	ND	ND	ND
Extrato de <i>E. uchi</i> (percolação)	ND	ND	ND	ND	ND
Anfotericina B	78	1250	1250	39	156

ND: Não detectado; Extrato EtOH: Extrato etanólico; FrAq: Fração Aquosa; FrBuOH: fração butanólica; FrAcOEt: Fração Acetato de Etila

3.2 Teste de atividade antifúngica *in vitro* realizado em placas de Petri

A atividade antifúngica ocorreu por meio de mensuração do halo do crescimento das colônias quando o extrato estava incorporado no meio de cultura. Foi realizado um controle negativo para evidenciar que o DMSO utilizado para a dissolução das amostras vegetais não interferiu na atividade

antimicrobiana. A identificação dos diâmetros pode ser visualizada a partir das tabelas e das figuras abaixo

Na tabela 3 podemos observar a atividade antimicrobiana dos extratos em meio sólido. Podemos notar que *A. niger* frente ao extrato etanólico de *P.cauliflora* apresentou uma redução no diâmetro das colônias enquanto na CIM não foi avaliada. O mesmo extrato frente *B. bassiana* mostrou redução no crescimento em ambas concentrações analisadas (1% e CIM). *M. anisopliae* sofreu inibição do crescimento nas condições analisadas, entretanto na concentração de 1% foi notada uma maior redução. Do mesmo modo a inibição de crescimento de *T. reesei* foi mais acentuada na concentração 1%. O extrato etanólico 1% inibiu totalmente o crescimento de *T. rubrum* e apresentou menor efeito quando testado na CIM.

TABELA 3.Diâmetro das colônias dos fungos frente ao extrato etanólico das folhas de *P. cauliflora*

Linhagens/Extrato	Halos(mm)		
	Concentração 1 %	Concentração CIM	Controle
Etanólico			
<i>A.niger</i>	29,60± 2,1(33.13)	ND	44,26± 0,09
<i>B.bassiana</i>	6,36 ± 0,37(56.5)	8,75± 0,59 (40.1)	14,60± 2,69
<i>M.anisopliae</i>	8,90 ±0,43(69.75)	19,46±0,67(33.86)	29,42± 0,02
<i>T. reesei</i>	27,46 ± 0,76(49.8)	43,90± 0,96(19.6)	54,60± 2,07
<i>T. rubrum</i>	NC	8,66± 0,90(25.4)	11,60± 1,4

As medidas são apresentadas em média de três determinações de halos \pm desvio-padrão, em mm, em parênteses estão representadas as porcentagens de inibição em relação ao controle. NC: Não crescimento. ND: Não detectado

Para ilustrar a ação antifúngica do extrato etanólico de *P. cauliflora*, apresentamos como exemplo as fotos obtidas dos testes nas Figuras 2 e 3.

Podemos observar na figura 2 a formação das colônias de *B. bassiana* em contato com o extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* na concentração de 1% e na concentração obtida pelo CIM, onde notamos a maior redução do diâmetro da colônia na concentração 1 %.

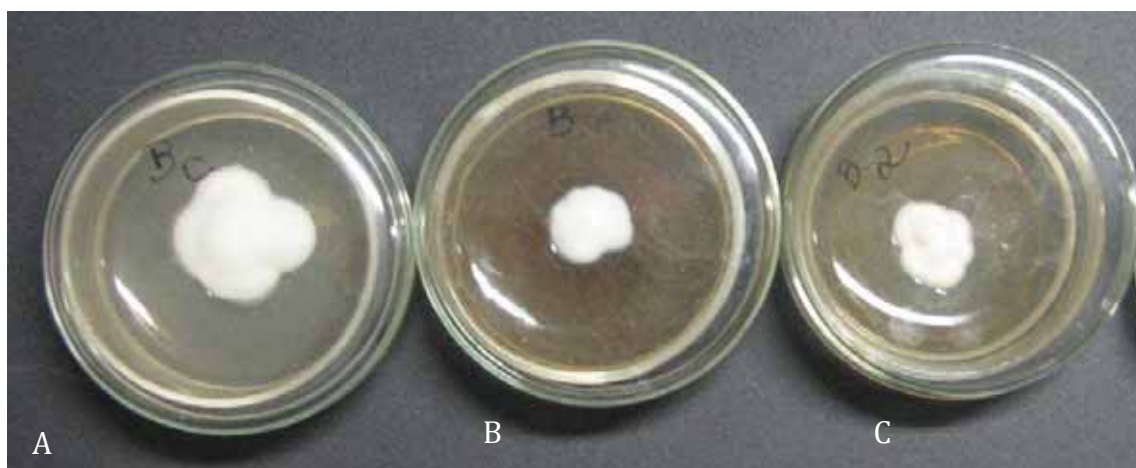


Figura 2: Colônias de *B. bassiana* frente ao extrato etanólico de *Plinia cauliflora* e controle de crescimento. **A:** controle de crescimento, **B:** extrato etanólico 1 %, **C:** extrato etanólico na concentração de CIM.

Na Figura 3 podemos observar a formação das colônias de *T. reesei* em contato com o extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* na concentração de 1% e na concentração obtida pelo CIM. Notamos que na concentração 1% o extrato apresentou maior inibição do crescimento.

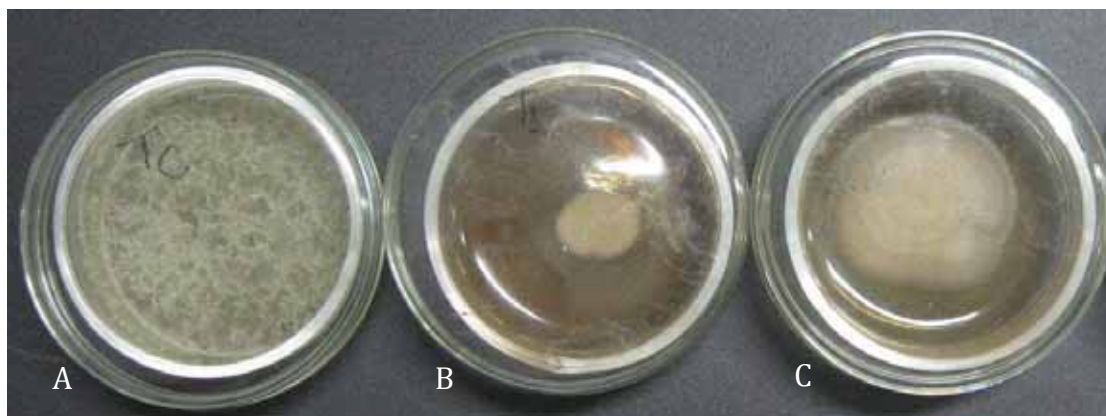


Figura 3: Formação das colônias de *T.reesei* frente ao extrato etanólico de *Plinia cauliflora* e controle de crescimento. **A:** controle de crescimento, **B:** extrato etanólico 1 %, **C:** extrato etanólico na concentração de CIM.

Com a figura 4 é possível ilustrar a ação do extrato etanólico de *Plinia cauliflora* frente aos micro-organismos utilizados neste trabalho. Vale lembrar que para o *Aspergillus niger* não foi realizado o teste na concentração de CIM uma vez que a mesma não foi obtida no teste anterior. O extrato etanólico na concentração 1% inibiu completamente o crescimento de *T. rubrum*.

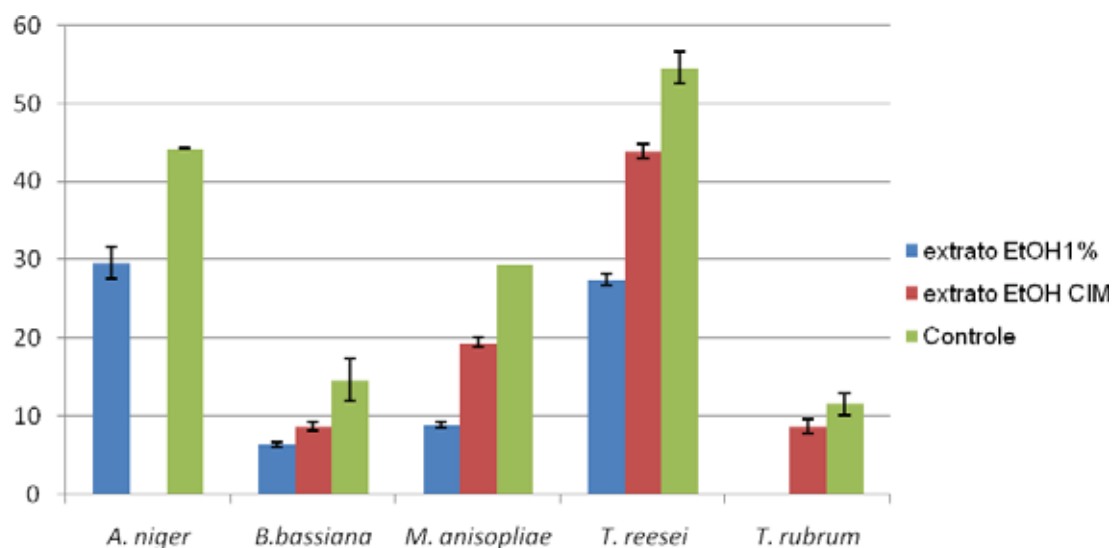


Figura 4: Diâmetro das colônias dos fungos quando em contato com o extrato etanólico de *P. cauliflora*.

Na tabela 4 podemos observar a atividade antimicrobiana da fração butanólica em meio sólido. Podemos notar que a formação do menor diâmetro ocorreu do contato de *B. bassiana* com a fração butanólica de *Plinia cauliflora* na concentração 1%. Na concentração obtida pelo CIM a menor colônia formada foi de *T. rubrum*. Foi evidenciado que não ocorreu o crescimento de *T. rubrum* frente a fração butanólica de *P. cauliflora* na concentração 1%.

TABELA 4: Diâmetros das colônias dos fungos em contato com a fração butanólica de *Plinia cauliflora*.

Halos(mm)			
Linhagens/FrBUOH	Concentração1%	Concentração CIM	Controle
<i>A.niger</i>	41,30± 3,85 (27.7)	ND	57,10 ± 0,03
<i>B.bassiana</i>	5,20 ± 0,64 (61.77)	4,90 ± 0,22 (64.0)	13,60 ± 0,16
<i>M.anisoplae</i>	16,91± 1,29 (42.6)	20,89 ± 1,99(29.0)	29,42 ± 0,02
<i>T. reesei</i>	53,55± 0,5 (13.0)	60,54 ± 0,41(2.0)	61,51± 0,03
<i>T. rubrum</i>	NC	0,14 ± 0,04(98.0)	7,00 ± 0,23

As medidas são apresentadas em média de três determinações de halo ± desvio-padrão, em mm, em parênteses estão representadas as porcentagens de inibição em relação ao controle. NC: Não crescimento.ND: Não detectado.

Para evidenciar a ação antifúngica da fração butanólica de *P. cauliflora* apresentamos os resultados obtidos através da figura 5. Podemos observar a formação das colônias de *T. rubrum* em contato com a fração butanólica de *Plinia cauliflora* na concentração de 1% e na concentração obtida

pelo CIM. É possível notar que não houve crescimento da colônia frente a fração na concentração 1%.

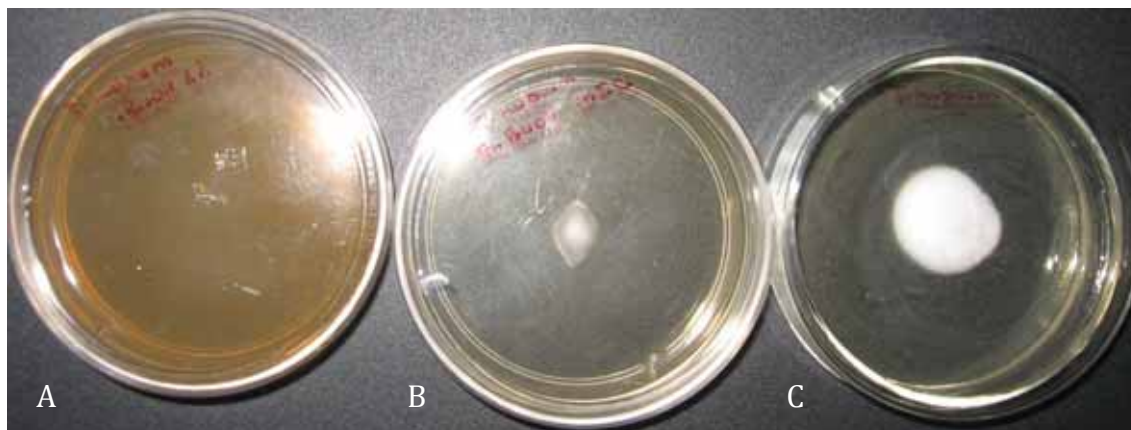


Figura 5: Colônias de *T. rubrum* frente a fração butanólica de *P. cauliflora*. **A:**FrBuOH 1%, **B:**FrBuOH na concentração de CIM, **C:** controle de crescimento.

Com a figura 6 é possível ilustrar a ação da fração butanólica de *Plinia cauliflora* frente aos micro-organismos utilizados neste trabalho. Vale lembrar que para o *Aspergillus niger* não foi realizado o teste na concentração de CIM uma vez que a mesma não foi obtida no teste anterior. A fração butanólica na concentração 1% inibiu completamente o crescimento de *T. rubrum*.

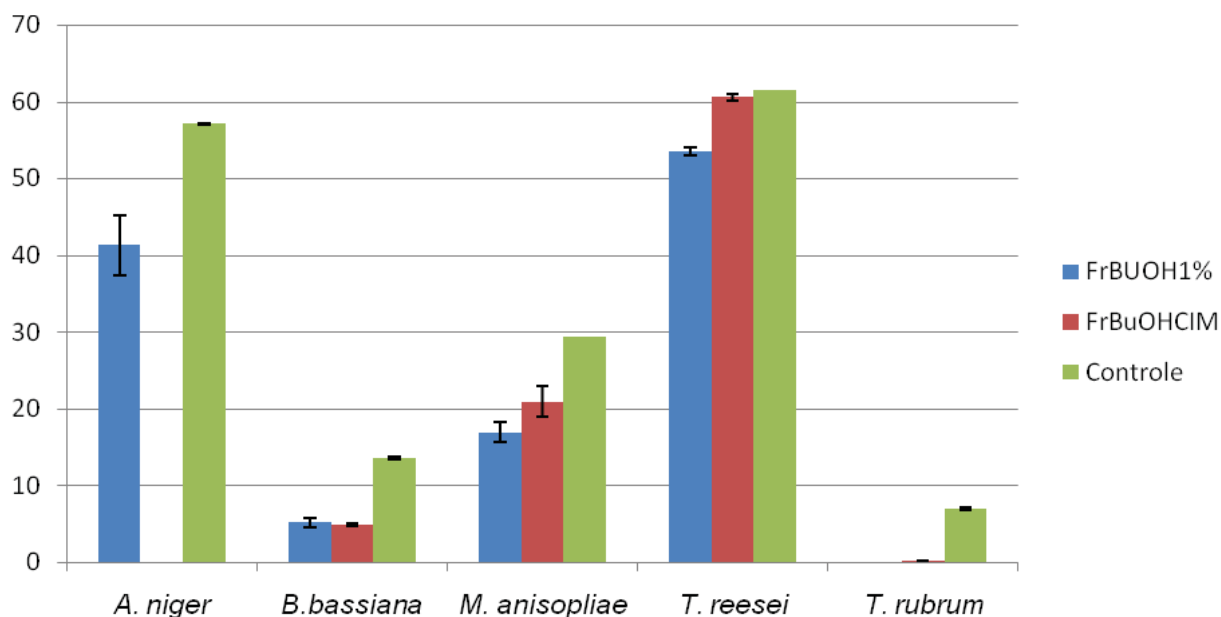


Figura 6: Diâmetro das colônias dos fungos frente a fração butanólica de *P. cauliflora* nas concentrações testadas (1% e CIM) e do controle de crescimento.

Na tabela 5 observamos o diâmetro das colônias frente a fração acetato de etila de *P. cauliflora*. Na concentração 1% da fração acetato de etila de *P. cauliflora* e também na concentração obtida pelo CIM a menor colônia formada foi de *M. anisopliae*. O maior diâmetro formado foi obtido do contato da fração acima citada com *T. reesei* indicando menor atividade antifúngica. Não ocorreu formação de halo de *T. rubrum* quando em contato com a fração na concentração de 1%, mostrando alta sensibilidade deste fungo a esta fração.

TABELA 5: Diâmetros das colônias dos fungos quando em contato com a fração acetato de etila de *Plinia cauliflora*.

Halos (mm)			
Linhagens/FrAcOEt	Concentração 1%	Concentração CIM	Controle
<i>A.niger</i>	36,90± 0,76(21.9)	ND	47,20 ± 0,03
<i>B.bassiana</i>	12,60± 1,61(46.48)	11,02± 1,18(53.2)	23,54± 0,80
<i>M. anisopliae</i>	10,22± 0,48(65.3)	8,96± 0,32(70.0)	29,42± 0,02
<i>T. reesei</i>	29,60± 7,13(51.9)	45,32± 1,43(26.3)	61,50± 0,44
<i>T. rubrum</i>	NC	14,30± 1,49(41.2)	24,30± 5,85

As medidas são apresentadas em média de três determinações de halo ± desvio-padrão, em mm, em parênteses estão representadas as porcentagens de inibição em relação ao controle. NC: Não crescimento. ND: Não detectado.

Para ilustrar a ação antifúngica da fração acetato de etila de *P. cauliflora*, apresentamos como exemplo as fotos obtidas dos testes nas Figuras 7 e 8. Podemos observar a formação das colônias de *B. bassiana* em contato com a fração acetato de etila de *Plinia cauliflora* na concentração de 1%, na concentração obtida pelo CIM e do controle de crescimento. O crescimento das colônias foi inibido pela fração acetato de etila na concentração 1% e no CIM.

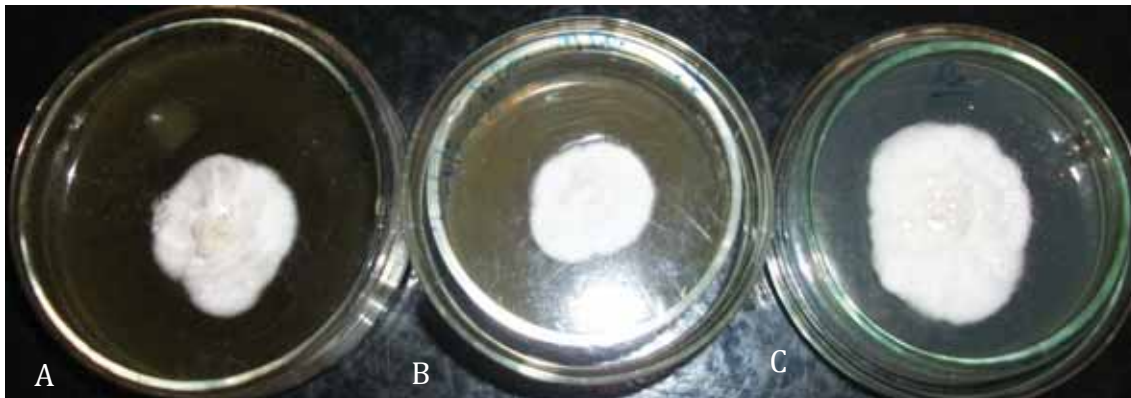


Figura 7: Colônias de *B. bassiana* em contato com a fração acetato de etila de *P. cauliflora*. **A:**FrAcOEt 1%, **B:**FrAcOEt CIM, **C:** controle de crescimento.

Na Figura 8 podemos observar a formação das colônias de *M. anisopliae* em contato com a fração acetato de etila de *Plinia cauliflora* na concentração de 1%, na concentração obtida com a determinação do CIM e de controle de crescimento que é mostrado na última placa. Houve redução acentuada de crescimento pela fração acetato de etila em ambas concentrações analisadas.

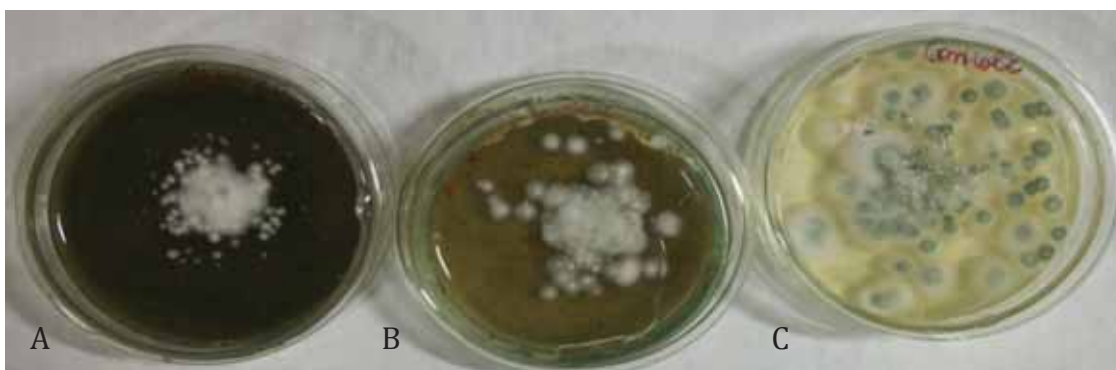


Figura 8: Colônias de *M. anisopliae* em contato com a fração acetato de etila de *P. cauliflora*. **A:**FrAcOEt 1%, **B:**FrAcOEt CIM, **C:** controle de crescimento.

Como figura 9 é possível evidenciar a ação da fração acetato de etila *Plinia cauliflora* frente as linhagens fúngicas utilizadas no trabalho. Vale lembrar que para o *Aspergillus niger* não foi realizado o teste na concentração de CIM uma vez que a mesma não foi obtida no teste anterior. A fração acetato de etila

na concentração 1% inibiu completamente o crescimento de *T. rubrum*.

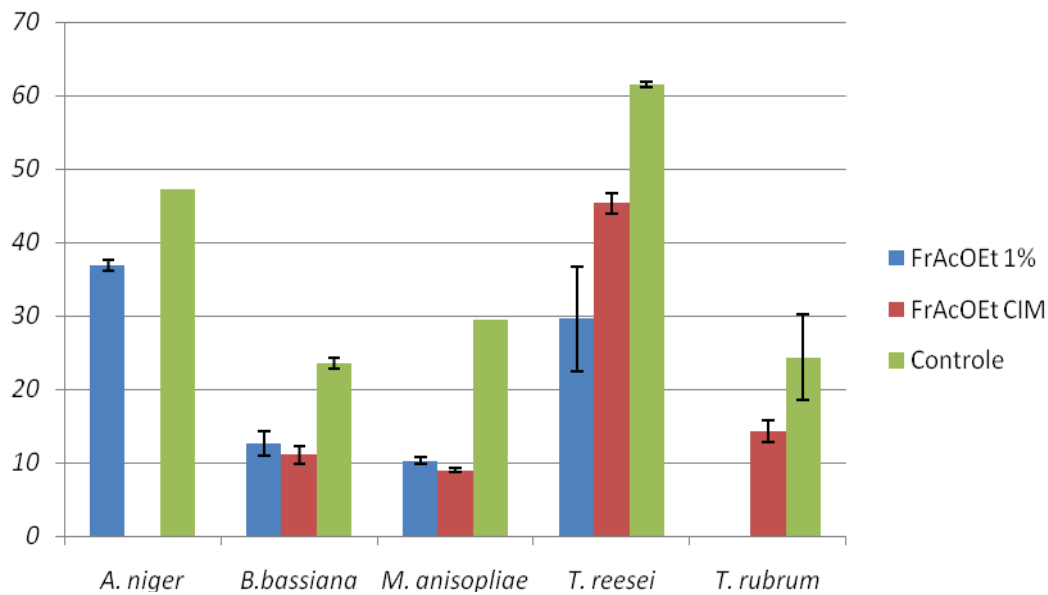


Figura 9: Diâmetro das colônias dos fungos frente a fração acetato de etila de *P. cauliflora* nas concentrações testadas (1% e CIM) e também do controle de crescimento.

Na tabela 6 observamos o diâmetro das colônias frente a fração aquosa de *P. cauliflora*. A tabela mostra que o menor diâmetro formado foi de *B. bassiana* frente a fração aquosa de *P. cauliflora* na concentração de 1% enquanto que na concentração obtida pelo CIM o menor halo formado foi do *T. rubrum*. Verificou-se que com fração aquosa 1% não houve formação do halo de *T. rubrum*. Os maiores halos foram obtidos do contato da droga vegetal (nas duas concentrações testadas) com *T. reesei*, estando bem próximos ao controle.

TABELA 6:Diâmetro das colônias dos fungos quando em contato com a fração aquosa de *Plinia cauliflora*.

Halos (mm)			
Linhasgens/FrAq	Concentração 1%	Concentração CIM	Controle
<i>A.niger</i>	46,24± 0,75 (2.0)	ND	47,20± 0,03
<i>B.bassiana</i>	10,31± 0,20 (58.3)	17,70± 1,53 (28.4)	24,70± 0,32
<i>M. anisopliae</i>	13,17 ± 1,44 (55.3)	21,33± 1,48 (27.5)	29,42± 0,02
<i>T. reesei</i>	54,81± 2,84 (4.4)	56,70± 0,61 (1.1)	57,31± 0,03
<i>T. rubrum</i>	NC	9,30± 0,25 (30.7)	13,41± 0,05

As medidas são apresentadas em média de três determinações de halo ± desvio-padrão, em mm, em parênteses estão representadas as porcentagens de inibição em relação ao controle. NC: Não crescimento. ND: Não detectado

Para evidenciarmos a ação antifúngica da fração aquosa de *P. cauliflora* apresentamos os resultados obtidos através da figura 10. Podemos observar a formação das colônias de *B. bassiana* em contato com a fração aquosa de *Plinia cauliflora* na concentração de 1%, na concentração obtida pelo CIM e do controle de crescimento. A menor colônia foi obtida com a presença de fração aquosa na concentração 1% enquanto no teste usando o CIM a inibição foi menor.

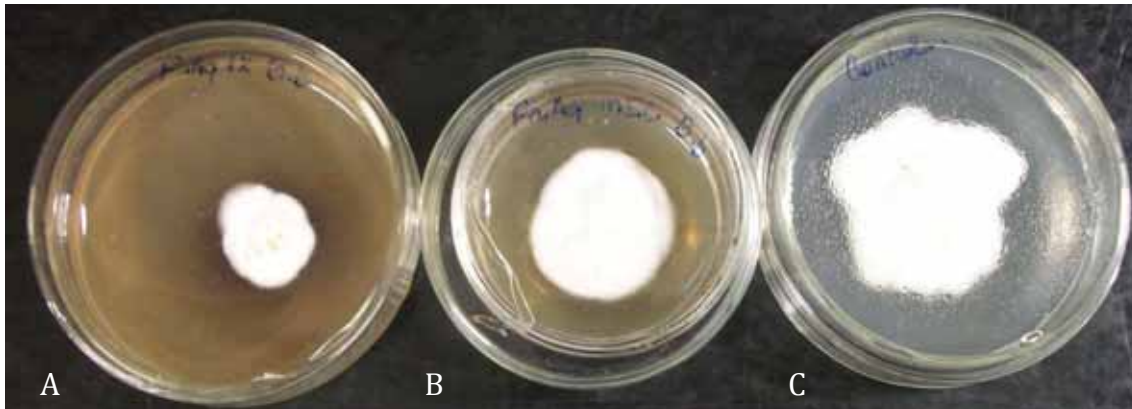


Figura 10: Colônias de *B. bassiana* frente a fração aquosa de *P. cauliflora*. **A:** FrAq 1%, **B:** FrAq CIM, **C:** controle de crescimento.

Com a figura 11 é possível verificar a ação da fração aquosa de *Plinia cauliflora* frente as linhagens fúngicas testadas. Vale lembrar que para o *Aspergillus niger* não foi realizado o teste na concentração de CIM uma vez que a mesma não foi obtida no teste anterior. A fração aquosa na concentração 1% inibiu completamente o crescimento de *T. rubrum*.

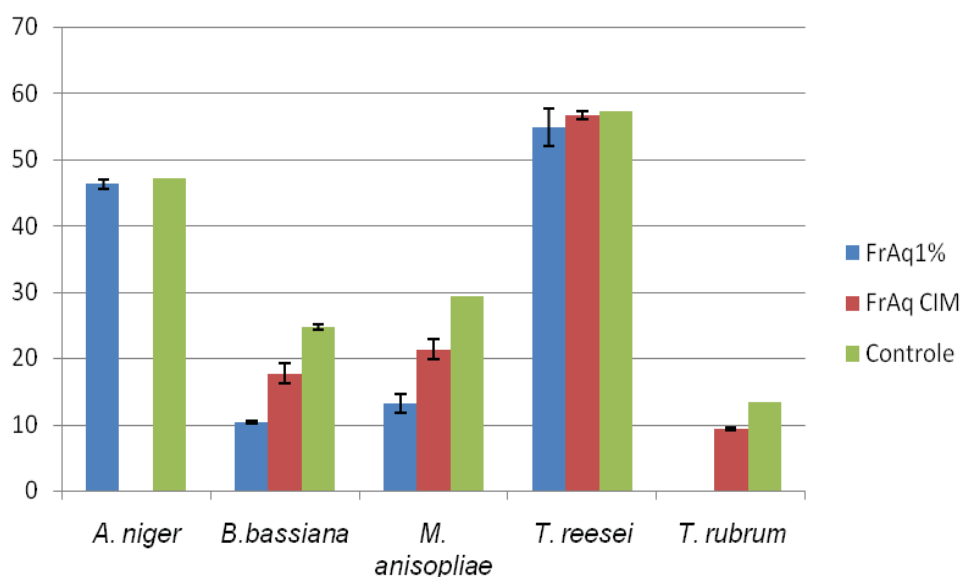


Figura 11: Diâmetro das colônias dos fungos frente a fração aquosa de *P. cauliflora* nas concentrações testadas (1% e CIM) e também do controle de crescimento.

Quando o teste de atividade antifúngica em placas de Petri foi realizado com a cepa industrial de *A. niger* o resultado obtido foi muito interessante uma vez que ocorreu uma mudança na coloração das colônias quando em contato com o extrato e as frações vegetais testadas. A figura mostra as colônias de *A. niger* em meio PDA e com o material vegetal incorporado no meio de cultura.

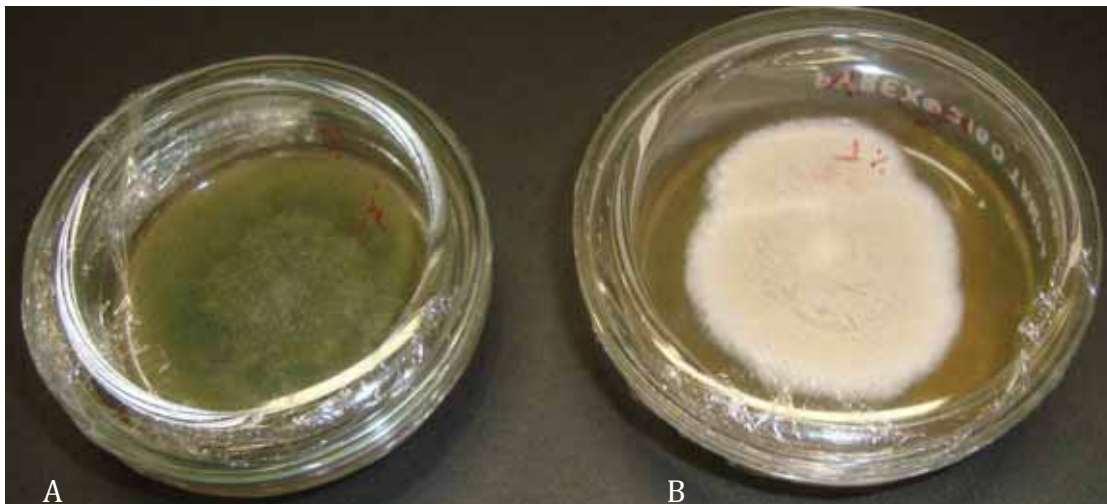


Figura 12: Colônias de *A. niger* em meio PDA **(A)**; colônias de *A. niger* em meio PDA incorporado com extrato etanólico de *P. cauliflora* na concentração 1% **(B)**

Diante deste fato, foi realizada uma análise microscópica para análise da morfologia de *A. niger*. Tal observação microscópica não evidenciou alterações morfológicas visíveis. O repique subsequente destas células para meio PDA fez com que a visualização macroscópica apresentassem coloração e tamanhos normais, cujas fotomicrografias são mostradas na figuras 13.

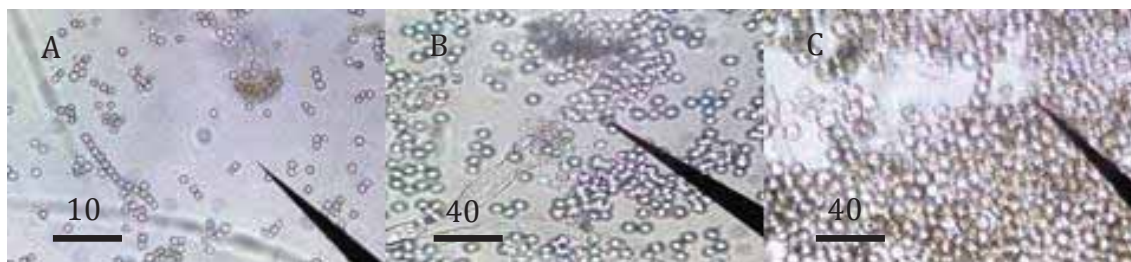


Figura 13: Fotomicrografia da análise microscópica da morfologia de *A. niger* em meio PDA (A) e Fotomicrografia da análise microscópica das colônias de *A. niger* em meio PDA incorporado com extrato etanólico de *P. cauliflora* (B) e Fotomicrografia do repique subsequente em meio PDA (C).

Como ficou evidenciado em nosso trabalho, a tabela a seguir demonstra e comprova a elevada sensibilidade do *T. rubrum* frente aos extratos e as frações de *P. cauliflora*

TABELA 7: Diâmetro das colônias de *T. rubrum* quando em contato com o extrato e as frações de *Plinia cauliflora*

Halos(mm)de			
<i>T.rubrum</i>			
Extratos e Frações	Concentração1%	Concentração CIM	Controle
Extrato EtOH	NC	8.66± 0,90 (25.4)	11.60 ± 1.4
FrBuOH	NC	0.14 ± 0,04 (98.0)	13,60 ± 0,16
FrAcOEt	NC	14,30 ± 1,49(41.2)	24,30 ± 5,85
FrAq	NC	9.30 ± 0,25(30.7)	13.41± 0,05

As medidas são apresentadas em média de três determinações de halo ± desvio-padrão, em mm, em parênteses estão representadas as porcentagens de inibição em relação ao controle. NC: Não crescimento.

4. Discussão

Desde o século XVII, agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados para o tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal deve exibir toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser nociva para o parasita e não para o hospedeiro. Assim, uma substância em concentração tolerada pelo hospedeiro pode danificar um microrganismo infectante (BROOKS et al., 2001; DAVIS, 1990).

Em vista da resistência que muitos patógenos humanos apresentam devido à seleção a que passaram pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, da emergência de infecções incomuns e efeitos adversos apresentados por alguns medicamentos, as pesquisas tornaram-se mais direcionadas às plantas medicinais, sendo que muitas espécies já se mostraram eficazes como agentes antimicrobianos (ZAMPINI et al., 2005).

A presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores, bem como o seu uso para tratar infecções não são fatos recentes e a humanidade as tem empregado desde muito tempo (BUHNER, 1999; COWAN, 1999; RODRIGUES, 1980; YUNES e CALIXTO, 2001).

Durante a sua vida, as plantas reagem a várias injúrias advindas do ambiente, e são capazes de produzir compostos antimicrobianos para protegê-las contra infecções causadas por patógenos como bactérias, fungos e vírus (ESQUENAZI et al., 2002; RODRIGUES, 1980; WOJTASZEK, 1997; YUNES e CALIXTO, 2001).

Baseado nestes estudos, e entre tantas plantas nativas e aclimatadas no Brasil, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato e das frações de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e de extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. especificamente contra *Beauveria bassiana*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum* e *Metarhizium anisopliae*.

Assim, para atingir os objetivos deste trabalho, foram necessários estudos destinados a avaliação da atividade antifúngica dos extratos vegetais especificamente utilizando uma adaptação da metodologia segundo o CLSI M38-A (NCCLS, 2002) para determinação da concentração inibitória mínima e realizando ensaios *in vitro* em microplacas. Prosseguindo nas análises de atividade antimicrobiana, foi feita a determinação da concentração inibitória para as linhagens fúngicas.

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida pela menor concentração de extrato que inibe o crescimento microbiano visível *in vitro* e cuja visualização é possível. Para aprimorar esta técnica foi desenvolvido o ensaio em microplaca, que permite observar a verificação da turvação dos poços (ANDREWS, 2001).

Em nosso trabalho não foi possível a determinação de CIM para a cepa industrial de *Aspergillus niger* uma vez que não houve inibição do crescimento do mesmo frente aos extratos vegetais nas concentrações testadas. Todos os outros micro-organismos apresentaram sensibilidade frente às drogas vegetais. O extrato etanólico e a fração acetato de etila de *P. cauliflora* apresentaram-se mais ativos em comparação com as frações butanólica e aquosa. Porém, em relação ao fungo *T. rubrum* o extrato etanólico e as frações de *P. cauliflora*

apresentaram a mesma sensibilidade com valores de CIM bem baixos. Os extratos de *E. uchi* não apresentaram atividade frente a tais linhagens de fungos testados. O fungo *T. rubrum* foi o que mostrou maior sensibilidade ao extrato etanólico de *P. cauliflora* e as suas frações.

Ainda não existe, na literatura, referências conclusivas sobre as faixas de CIM e sua correspondência à atividade farmacológica. Holetz et al. (2002) estabeleceram alguns valores como referência de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Em tal trabalho, para que um extrato apresente forte atividade, a CIM não deve ultrapassar 100 µg/mL; de 100 a 500 µg/mL a atividade é considerada como moderada; de 500 a 1000 µg/mL a atividade é fraca e maior que 1000 µg/mL, o extrato é considerado inativo. Entretanto, não podem ser desprezados outros trabalhos em que valores de CIM maiores são tidos como boa atividade para tais extratos. Vale ressaltar que partindo do resultado de CIM de 78µg/mL para *T. rubrum* é possível dizer que o extrato e as frações de *P. cauliflora* apresentam forte atividade frente a tal fungo.

Outros estudos também estabelecem alguns critérios sobre a atividade antimicrobiana. Assim, Duarte et al. (2005) apresentam em seu trabalho uma proposta de Aligiannis et al. (2001) de classificação para material vegetal baseada em resultados de CIM, no qual CIM menores que 0,5 mg/mL são considerados fortes inibidores, CIM entre 0,6 a 1,5 mg/mL são considerados moderados e acima de 1,6 mg/mL são fracos inibidores do crescimento microbiano.

De forma geral, o extrato de uma planta contém baixa concentração de compostos ativos e um amplo número de outros compostos que podem ter atividades promissoras, necessitando de uma adequada sensibilidade dos

testes, devido à variedade química destes compostos, muito embora presentes em pequena quantidade (RATES, 2001).

Em nosso trabalho podemos considerar que os extratos estudados que apresentaram valores de CIM entre 1,25 e 2,5mg/mL não devem ser desprezados, seja pela diluição dos compostos ativos com outros compostos também extraídos, seja porque a própria literatura não descarta resultados de CIM maiores que 1,0 mg/mL, pois poderiam ser utilizados para outros propósitos. Entretanto vale ressaltar que *T. rubrum* foi a espécie que mostrou grande sensibilidade ao extrato e frações de *P. cauliflora* com valores de CIM bem baixos.

A espécie de *Trichophyton rubrum*, importante agente de dermatofitoses, é um fungo queratinofílico, capaz de parasitar tecidos como pele e unha. É o principal responsável pelas dermatofitoses crônicas e refratárias ao tratamento e como é uma espécie antropofílica encontra-se muito bem adaptado ao parasitismo humano.

A atividade antifúngica também foi avaliada através de testes realizados em placas de Petri de 5cm de diâmetro, na qual foi adicionado o meio de cultura PDA e onde o extrato e as frações vegetais foram incorporados. Após a solidificação do conteúdo da placa foi realizado um inóculo central de pequenas amostras dos fungos utilizados neste trabalho. As placas foram inoculadas e após o crescimento, as medidas dos diâmetros das colônias foram realizadas. A partir de então foi possível evidenciar que os menores diâmetros foram obtidos com a fração butanólica de *P. cauliflora*. O extrato etanólico, fração butanólica e a fração aquosa de *P. cauliflora*, na concentração 1% e também na concentração obtida pelo CIM, mostraram maior efetividade frente a *T.*

rubrum. Em contrapartida, a fração acetato de etila, apesar de apresentar maior efetividade frente a *T. rubrum* na concentração de 1%, mostrou ser mais efetiva contra *M. anisopliae* quando testada com a concentração obtida pelo CIM.

No trabalho de AMARAL, et al. (2005), foi avaliado o efeito antifúngico do extrato de açafrão (*Curcuma longa* L, Zinziberaceae) e de coração negro (*Albizzia lebbbeck* Benth, Leguminosiae) na concentração de 1% em agar PDA frente a fitopatógenos. Foi relatado que na concentração de 1%, o açafrão levou a uma inibição superior a 50% no crescimento de *F. oxysporum* (61,15%) e *R. solani* (61,1%). O extrato de coração negro causou uma discreta atividade antifúngica sobre *F.oxysporum* (6,75%) e *M. phaseolina* (15%).

Cáceres et al. (1991) relatam que a goiabeira apresenta atividade antimicótica, através do macerado hidroalcoólico de suas folhas contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida stellatoidea*, fato este também comprovado em experimento *in vitro*, no estudo de Alves et al (2006).

Apesar de não ter sido evidenciado uma grande atividade dos extratos vegetais frente ao *A. niger* no teste de determinação de CIM, foi realizado o teste em placas de Petri. As colônias formadas apresentaram diâmetros elevados, porém foi obtido como resultado interessante uma alteração na cor das colônias, o qual quando em contato somente com o meio de cultura PDA, apresentou coloração esverdeada e em contato com o meio de cultura contendo o material vegetal foi verificado uma coloração bege. A análise da morfologia microscópica, a partir de lâminas, não evidenciou alterações na morfologia interna do fungo.

Nosso trabalho ressalta a forte atividade do extrato etanólico e frações de *P. cauliflora* frente a *T. rubrum*. Estudos posteriores podem conduzir a geração de novos produtos com tal propriedade, contendo os princípios ativos dessa espécie vegetal.

5. Conclusão

Com este trabalho, foram obtidos os valores de CIM contra *Beauveria bassiana*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum* e *Metarhizium anisopliae*, para o extrato etanólico e as frações de *P. cauliflora*. Tais resultados nortearam os estudos para a avaliação da atividade antifúngica em placas de Petri a partir da mensuração dos diâmetros das colônias dos fungos. As conclusões estão apresentadas a seguir.

✓ O extrato etanólico obtido das folhas de *Plinia cauliflora* e suas frações demonstraram atividade antifúngica elevada quando em contato com *T. rubrum* fato que foi observado através da determinação de CIM.

✓ O extrato etanólico e as frações de *Plinia cauliflora* apresentaram excelentes resultados uma vez que na concentração de 1% inibiu completamente o crescimento de *T. rubrum*, fato que foi observado no plaqueamento.

✓ O teste de avaliação do crescimento radial das colônias dos fungos complementou os resultados obtidos através da determinação de

CIM, sendo que comprovou a elevada efetividade do extrato etanólico e das frações de *P. cauliflora*, na concentração 1% e também na concentração obtida pelo CIM frente a *T. rubrum*.

✓ De um modo geral, a fração butanólica de *P. cauliflora* mostrou a maior atividade frente a *T. rubrum*.

✓ Extratos de *Endopleura uchi* não apresentaram atividade frente aos micro-organismos avaliados pela determinação de CIM.

6. Referências Bibliográficas

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento Vol 2, n.2, p. 5- 8, 2005.*

ALLIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. **Journal od Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.9, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V; PEREIRA, L.F; PEREIRA, M.S.V.; HIGINI, J.S.; LIMA, E.O. **Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro***; *Revista Brasileira de Farmacognosia*. V.16. n.2., 2006.

ANDREWS, J.M. Determination oh minimum inhibitory concentrations **.Journal Antimicrobiana chemother**, v.48, p.5-16, 2001.

BARBOUR, E.K.; AL SHARIFA, M.; SAGHERIANA, V.K.; HABREA, A.N.; TALHOUK, R.S.; TALHOUK, S.N. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.1-7, 2004.

BRITO, A. R. M. S. Toxicidade aguda (dose simples). In: **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: UNICAMP; Rio de Janeiro: Editora Três,1996, p.15-22.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick&Adelberg's Medical Microbiology**. 22ed. USA: Lange Medical Books/McGrawHill,2001.

BUHNER, S.H. **Herbal antibiotics: Natural Alternatives for Treating Drug – Resistant Bacteria (A medicinal herb guide)**. Pownal, Vermont: Storey Books, 1999.

CÁCERES A, ALVAREZ AV, OVANDO AEO, SAMAYOA BE 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol* 31: 193-208.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*,1998,21(1), p. 99-105.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.6, 764p.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DARWISH, R.M.; ABURJAI, T.; AL-KHALIL, S.; MAHAFZAH, A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p. 359-364, 2002.

DAVIS, B.D. Chemotherapy. In.: DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S. Microbiology. 4ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1990, p.201-228.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S.; RODRIGUES, H.M. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocosnucifera*Linn. (Palmae) husk fiber extract.**Research in Microbiology**, v.153, n. 10, p. 647-652, 2002.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil.1.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira S.A.. 1959.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3.ed. London: Academic, 1988.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F. 2002. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova* 25: 429-438.

MARTINS, A. B., SACRAMENTO, L. V. S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primário de matéria-prima vegetal pulverizada. In:1998

MERTZ, N.R; ALVES, L.F.A; MARCOMINI, AM; OLIVEIRA, D.G.P; SANTOS,J.G. Efeito de produtos fitosanitários naturais sobre *B. bassiana* (Bals) *in vitro*. Revista Bioassay n.5, p.3, (2010).

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; ORWUTE, K.A modern look at folkloric use of anti-infective agents.**Journal of Natural Products**, v.50, n.6, p.1025-1040, 1987.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard M-38A. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.

OLIVEIRA, A. L.; PADILHA, C. D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Marcela), Asteraceae: Avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares da otimização da extração. **Cad. Farm.**, v.17, n.1, p.33-38, 2001.

FLÁVIO A. S. POLITI, JOÃO C. P. DE MELLO , KETYLIN F. MIGLIATO, ANDRÉA L. A. NEPOMUCENO , RAQUEL R. D. MOREIRA, ROSEMEIRE C. L. R. PIETRO. **Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*, 2011.**

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 2001, v. 39, p. 603-613.

REDDY, V.L.N.; RAVIKANTH,V; LAKSHMI,V.V.N.S.J; MURTY, U.S; VENKTERWARLU,Y. Inhibitory activity of homoisoflavonóides from *Caesalpinia sappan* against *B. bassiana*. *Revista Fitoterapia A4* (6) p. 600- 602, 2003.

RODRIGUES Jr, C.J. **Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogénicos**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980. p.23.

SANTOS AC, MELLO JCP 2004. Taninos. In: Simões CMO,Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed.Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/Ed. da UFSC. p. 615-656.

SOUZA-MOREIRA, T.M; MOREIRA, R.R.D; SACRAMENTO,L.V.S; PIETRO, R.C.LR. **Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves**. *Brasilian Journal of Farmacognosy* 20 (1) : 48-53, 2010.

SOUZA, T.M. Estudos farmacognósticos e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas

contendo o extrato das folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosidae). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

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

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 681-692, 1997.

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

ZACCHINO, S. 2001. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes, RA, Calixto JB (ed.), *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Ed. Argos, p. 435-479.

ZAMPINI, I.C.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 450-456, 2005.

