

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, MECANISMO  
DE AÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DE *Trichophyton  
rubrum* E *Microsporum canis* FRENTE A DERIVADOS DE *Piper  
umbellatum***

**JOLINDO ALENCAR FREITAS**

Araraquara, SP  
2015

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

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, MECANISMO  
DE AÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DE *Trichophyton  
rubrum* E *Microsporum canis* FRENTE A DERIVADOS DE *Piper  
umbellatum***

**JOLINDO ALENCAR FREITAS**

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

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro**

**CO-ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Marisa Fusco Almeida**

Araraquara, SP  
2015

**Ficha Catalográfica**

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

**F866i** Freitas, Jolindo Alencar  
Investigação da atividade antifúngica, mecanismo de ação e análise do perfil proteico de *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* frente a derivados de *Piper umbellatum* / Jolindo Alencar Freitas – Araraquara, 2015  
93 f.

Dissertação (Mestrado) – 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. *Piper umbellatum*. 2. Atividade antifúngica. 3. *Microsporum canis*. 4. *Trichophyton rubrum*. 5. 4-Nerolidilcatecol. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Ana Almeida, Marisa Fusco, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

## DEDICATÓRIA

Não teria como dedicar à outra pessoa senão à minha mãe, Aparecida Silberschmidt Freitas, que se tornou parte de mim. A quem tentei acompanhar e dividir meu tempo, minhas atenções e meu foco durante a maior parte desse mestrado. Ainda assim não chegando aos pés do tanto que essa mulher gigante de coração dedicou toda sua vida aos outros, mesmo enquanto lutava contra o câncer só para poder ver os filhos encaminhados na vida. Primeiro dedicou a adolescência em ajudar a criar os irmãos, sempre apoiou meu pai e ajudou a cuidar do jornal que foi o sonho e a realização da vida deles. Voltou a sua dedicação a nós, seus filhos e ao seu irmão Celso e, quando todos ao seu redor pareciam não precisar mais tanto de sua ajuda, buscou ajudar os mais carentes tanto no âmbito econômico/social através do no Lar Redenção e tantos outros, quanto espiritualmente nas assistências no centro. E, mesmo com toda dor, mal conseguindo respirar, até em suas últimas palavras só conseguiu pensar em nós, sua família, dedicando-as como forma de amparo e conforto. Com certeza você se orgulharia dessa conquista.

Deixo aqui mais um pequeno gesto em sua homenagem para dizer que você nunca será esquecida e deixou um pedaço de si dentro de cada um de nós.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, pelo apoio incondicional (não só financeiro) em pequenos e grandes gestos que hoje consigo ver e que sei que nunca serei capaz de pagar/recompensar completamente.

Aos meus irmãos e a todos que me ajudaram indiretamente e/ou participaram da minha vida durante esse tempo de mestrado e que não irei enumerar por medo de esquecer alguém, mas saibam que estava pensando em cada um de vocês enquanto escrevia.

Agradeço à Professora Rosemeire pela oportunidade de aprendizado, pela supervisão e confiança oferecida. Conjuntamente agradeço ao Rodrigo e a todos do laboratório de Biotecnologia (Nayara, Leidi, Ju, Maria, Flávio, Rafa), que acompanharam cada passo e maluquice que eu inventava no laboratório, bem como pela troca mútua de conhecimento e risadas entre todos.

Agradeço também ao Professor André e a todos do laboratório de Farmacognosia (Perego, Flávio, Juhan, Isa, e Bruna que era intrusa que nem eu), por me receberem de portas abertas, não só com o empréstimo de reagentes e equipamentos, mas com troca de conhecimento e muitas risadas.

À Cláudia, Jussara e Mari do laboratório multiusuário, que me acompanharam, me cobriram na correria (e sofreram junto) durante os experimentos de CLAE e tornaram mais divertida a semana em que passei lá.

À Angélica pela confecção das lâminas e ao Professor Luís Vitor, não só pela ajuda na autenticação da planta, mas mais ainda pelas aulas de yoga, que foi uma fonte de energia para esses últimos meses e com isso me abriu as portas para um novo jeito de ver o mundo.

À Professora Lourdes e ao Felipe (Bozo) que me ajudaram na obtenção dos espectros de RMNs e identificação das substâncias que sofri tanto para conseguir.

À Cláudia, Mônica e Vanessa que me ajudaram com a cito e todo o pessoal da proteômica, que eu sempre buscava um auxílio, uma tirada de dúvida ou um protocolo a mais.

Ao Prof. Dr. José César Rosa do Centro de Química de Proteínas da FMRP/USP por toda a parte da análise proteômica e sequenciamento de peptídeos.

Ao programa de pós-graduação e à CAPES.

À FAPESP, pelo apoio financeiro através de concessão de bolsa, relacionado ao processo número 2013/10578-0 vinculado ao projeto **“Investigação da atividade antifúngica, mecanismo de ação e análise do perfil proteico de *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* frente a derivados de *Piper umbellatum*”** com vigência de 01/09/2013 a 30/06/2015.

**RESUMO**

*Piper umbellatum* L. Miq. é uma planta pertencente à família Piperaceae encontrada em todas as regiões do Brasil e tradicionalmente usada para diversas enfermidades e afecções. O trabalho visou estudar a atividade antifúngica de *P. umbellatum* frente a isolados clínicos de *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico de partes aéreas de *Piper umbellatum* levou ao isolamento de 2 substâncias, a sesamina e o 4-nerolidicatecol (4NC). Frente a *M. canis*, o extrato etanólico apresentou CIM de 39,1 µg/mL, o hexânico apresentou CIM de 1250 µg/mL, enquanto os extratos clorofórmico e acetato de etila apresentaram CIMs de 78,13 µg/mL, sendo 16 µg/mL para o fluconazol como controle positivo para ambos os fungos. O fracionamento do extrato etanólico levou à obtenção da fração 11 que apresentou o melhor valor de CIM entre as frações, de 9,77 µg/mL para o *M. canis*. O 4NC foi obtido desta fração 11 e apresentou os melhores CIMs observado deste estudo, de 2,4 µg/mL para *M. canis* e 4,88 µg/mL, para *T. rubrum*. Após tratamento com 4NC, *Microsporum canis* demonstrou uma alteração no perfil proteico avaliado por SDS-PAGE, com o aparecimento de bandas de aproximadamente 139 e 30 kDa entre as proteínas intracelulares e de 35 e 15 kDa entre as extracelulares, bandas que foram analisadas por LC-MS/MS (MALDI-TOF/TOF). O extrato etanólico não demonstrou citotoxicidade a 500 µg/mL, enquanto o 4NC apresentou valores de IC<sub>50</sub> de 18,3 e 31,5 µg/mL frente às linhagens de Hep G2 e MRC-5.

**Palavras-chave:** *Piper umbellatum*, atividade antifúngica, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, 4-Nerolidilcatecol.

## ABSTRACT

*Piper umbellatum* L. Miq. is a plant belonging to the Piperaceae family found in all regions of Brazil and traditionally used for various diseases and disorders. This work evaluates the antifungal activity of *P. umbellatum* against clinical isolates of *Microsporium canis* and *Trichophyton rubrum* by the determination of minimal inhibitory concentration (MIC). The phytochemical study of hexane and ethanol extracts of the aerial parts of *Piper umbellatum* led to the isolation of two substances, sesamin and 4-nerolidylcatechol (4NC). When tested against *M. canis*, the ethanol extracts showed MIC value of 39.06 µg/mL meanwhile the chloroform and ethyl acetate extracts showed MICs value of 78.13 µg/mL and the hexane extract showed MIC of 1250 µg/mL, the MIC value of fluconazole used as control was 16 µg/mL. The fractionation of the ethanol extract led to obtain of fraction 11 that presented the best MIC between the fractions, of 9.77 µg/mL to *M. canis*. 4NC was obtained from fraction 11 and presented the best MIC in this study, 2.44 µg/mL for *M. canis* and 4.88 µg/mL, for *T. rubrum*. *M. canis* showed a change in the protein profile in SDS-PAGE after treatment with 4NC, with the appearance of bands of approximately 139 and 30 kD intracellular protein and 35 and 15 kDa in extracellular protein, each of those bands was analyzed through LC-MS/MS (MALDI-TOF/TOF). The ethanolic extract wasn't citotoxic until 500 µg/mL, while 4NC presented IC<sub>50</sub> values of 18.3 and 31.5 µg/ml to Hep G2 and MRC-5 cell lines.

**Keywords:** *Piper umbellatum*, antifungal activity, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, 4-nerolidylcatechol.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

4NC: 4-nerolidilcatecol

AcOEt: Acetato de etila

CC: Cromatografia em coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Clorof.: Clorofórmio

dd: duplo dubleto

d.i.: diâmetro interno

DMEM: Dulbecco modified Eagle's medium

DMSO: Dimetilsufóxido

EFS: Extração em Fase Sólida

EtOH: Etanol

Hex: Hexano

IC: índice de citotoxicidade

*J*: constante de acoplamento

m: múltiplo

MALDI-TOF-MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight Mass Spectrometry

MeOH: Metanol

ppm: partes por milhão

PPT: Precipitado

Prep: Preparativo

$R_f$ : fator de retenção

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RPM: rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

s: singleto

SDS: dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

UV: ultravioleta

**ÍNDICE**

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	3
	2.1 Dermatófitos .....	3
	2.2 Antifúngicos .....	8
	2.3 Piper umbellatum L. Miq. (Piperaceae) .....	11
3	OBJETIVOS .....	16
4	MATERIAIS .....	18
	4.1 Equipamentos .....	18
	4.2 Solventes, reagentes e meios de cultura .....	19
	4.3 Soluções .....	21
5	METODOLOGIA .....	23
	5.1 Matéria Vegetal .....	23
	5.1.1 Autenticação da droga vegetal .....	23
	5.2 Preparo do extrato e frações .....	24
	5.2.1 Obtenção dos extratos .....	24
	5.2.2 Frações líquido-líquido .....	25
	5.2.3 Cromatografia em Coluna .....	25
	5.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	29
	5.4 Pré-tratamento das amostras para CLAE .....	30
	5.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	30
	5.6 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear .....	31
	5.7 Diluição dos extratos vegetais e frações .....	31
	5.8 Ensaio de atividade microbológica .....	31
	5.8.1 Fungos .....	31
	5.8.2 Preparo do inóculo .....	31
	5.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	31
	5.9 Determinação da Citotoxicidade .....	32
	5.10 Avaliação da alteração no perfil proteico em eletroforese gerada por tratamento com 4NC .....	33
	5.10.1 Obtenção de proteínas extracelulares .....	34
	5.10.2 Obtenção de proteínas intracelulares .....	34
	5.10.3 Dosagem de proteínas .....	34
	5.10.4 Análise proteômica .....	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
	6.1 Autenticação da droga vegetal .....	36
	6.2 Obtenção dos extratos .....	39
	6.3 Fracionamento por Cromatografia em coluna .....	40

6.4	Análises em CLAE-UV .....	43
6.5	Identificação de substâncias .....	47
6.5.1	Substância 1 - Sesamina.....	47
6.5.2	4- nerolidilcatecol .....	49
6.6	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	53
6.7	Determinação de CIM na presença de sorbitol e ergosterol exógeno .....	58
6.8	Citotoxicidade .....	60
6.9	Avaliação da alteração no perfil proteico gerada por tratamento com 4NC ...	62
6.9.1	Análise do perfil proteico através de eletroforese em gel de poliacrilamida .....	62
7	CONCLUSÕES .....	70
8	REFERÊNCIAS .....	70
	Anexo I - Laudo técnico partes aéreas de <i>P. umbellatum</i> .....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos principais antifúngicos comerciais. ....	9
Figura 2 – Exemplar de <i>Potomorphe umbellatum</i> cultivado no Jardim de Plantas Medicinais na Faculdade de Ciências Farmacêuticas.....	12
Figura 3 - Fluxograma da obtenção de derivados de <i>P. umbellatum</i> avaliados para atividade antifúngica (CIM) .....	24
Figura 4 – Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico de partes aéreas de <i>P. umbellatum</i> por partição líquido-líquido seguida de cromatografia em coluna. ....	26
Figura 5- Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de partes aéreas de <i>P. umbellatum</i> .....	28
Figura 6 – Autenticação de droga vegetal por fotomicrografias de sessões transversais foliar de <i>P. umbellatum</i> . ....	38
Figura 7 – Análise CCD em sílica gel de extratos de partes aéreas de <i>P. umbellatum</i> obtidos com diferentes solventes .....	39
Figura 8 – Análise CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC1 .....	40
Figura 9– Análise CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC2.....	41
Figura 10 – Análise CCD em sílica gel 60G das frações provenientes de CC3.....	41
Figura 11 – Análise CCD em sílica gel 60G da CC4 .....	42
Figura 12 – Análise CCD em sílica gel 60G das frações provindas de CC5.....	42
Figura 13 – Análise CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC6.....	43
Figura 14 – CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC7 .....	43
Figura 15 – Cromatograma em CLAE-UV da fração 17-18 da CC7 .....	44
Figura 16 – Cromatograma em CLAE-UV da fração 17-18 da CC7 .....	44
Figura 17 – Cromatograma em CLAE-UV da fração 19-22 da CC7 .....	45
Figura 18 – Cromatograma em CLAE-UV PREP para obtenção da Substância 2 .....	45
Figura 19 – Cromatograma em CLAE-UV da Substância 2 .....	46
Figura 20 - Estrutura molecular da substância 1 – sesamina. ....	47
Figura 21 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância 1 (300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	48
Figura 22 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância 1 (75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	49
Figura 23 - Estrutura molecular substância 2 – (4-nerolidilcatecol). ....	50
Figura 24 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 2. ....	52
Figura 25 - Espectro de <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 2. ....	52
Figura 26 – Gel SDS-PAGE 12% de proteínas extracelulares em diferentes concentrações de <i>M. canis</i> após tratamento com DMSO ou 4NC.....	63
Figura 27 – Gel SDS-PAGE 12% de proteínas extracelulares (na concentração de 115 ug/mL) de <i>M. canis</i> após tratamento com DMSO ou 4NC. ....	64
Figura 28 – Gel SDS-PAGE 12% de proteínas intracelulares em diferentes concentrações de <i>M. canis</i> após tratamento com DMSO ou 4NC.....	65
Figura 29 – Gráficos de distribuição espectrométrica ( <i>score</i> ) obtida após análise pelo MASCOT.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da substância 1</b> (δ ppm, DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz <sup>1</sup> H e 75Hz <sup>13</sup> C) obtidos experimentalmente em comparação com a literatura (δ ppm, DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz <sup>1</sup> H e 75Hz <sup>13</sup> C).....	48
<b>Tabela 2 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C da substância 2</b> (δ ppm, CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz <sup>1</sup> H e 75Hz <sup>13</sup> C) em comparação com a literatura (δ ppm, CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz <sup>1</sup> H e 75Hz <sup>13</sup> C).....	51
<b>Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes extratos de <i>P. umbellatum</i> e antifúngicos.</b> .....	54
<b>Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de frações de CC1 e precipitados obtidos do extrato hexano de <i>P. umbellatum</i>.</b> .....	55
<b>Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de frações obtidas de CC4 da partição hexânica do extrato etanólico de <i>P. umbellatum</i></b> .....	56
<b>Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de frações obtidas pelo fracionamento CC5 de <i>P. umbellatum</i> e 4NC.</b> .....	56
<b>Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) na presença e ausência de ergosterol e sorbitol para frações de CC5 e extratos de <i>P. umbellatum</i> e antifúngicos contra isolado clínico de <i>M. canis</i>.</b> .....	59
<b>Tabela 8 - Avaliação do IC50 (µg/mL) do 4NC, dos extratos etanólico e clorofórmio e das frações de CC5 frente às linhagens celulares HepG2 e MRC-5.</b> .....	60
<b>Tabela 9 - Análise proteômica parcial do secretoma de <i>Microsporium canis</i> de sequências com cobertura acima de 80%</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

Micoses são infecções causadas por fungos que normalmente ficam restringidas à pele. Algumas infecções são capazes de gerar complicações mais severas à saúde podendo se tornar fatal em alguns casos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Em países de clima quente e úmido, principalmente próximos aos trópicos, as condições climáticas facilitam a manutenção e proliferação fúngica, gerando uma alta incidência desse tipo de doença.

As “tineas” ou “tinhas” são causadas por um grupo de fungos conhecidos como dermatófitos. Normalmente a doença é nomeada pela região em que se manifesta (*pedis* – pé; *barbae* – barba; *corporis* – corpo todo; *capitis* – cabeça). Apesar de não colocar a vida do paciente em risco, esse tipo de infecção que pode acometer qualquer indivíduo, gera um enorme desconforto físico e psicológico devido a dores, coceiras e inflamações, além de um desconforto estético.

Outra afecção gerada por dermatófitos é a onicomicose, uma infecção de unha, em que o dermatófito normalmente está associado a outro microorganismo. Em ambos os casos, tanto nas tineas quanto nas onicomicoses, os tratamentos utilizados são complexos, envolvendo administração medicamentosa tópica e sistêmica, e duradouros, podendo durar meses em alguns casos. Além disso, a alta similaridade de células fúngicas e de animais permite poucos alvos na célula fúngica que gerem seletividade, resultando na toxicidade no caso de medicamentos sistêmicos, ou ação irritante quando em uso tópico apresentados pelos antifúngicos comerciais.

A busca por novos antifúngicos representa um grande desafio, seja pela dificuldade em selecionar alvos de ação ou pela facilidade que os mesmos tem em gerar respostas de resistência.

Os mecanismos de ação dos medicamentos antifúngicos comerciais são em sua maioria associados ao ergosterol presente na membrana fúngica, ligando-se diretamente a ele ou inibindo sua síntese. Essa baixa quantidade de mecanismos de ação torna-se uma preocupação do ponto de vista microbiológico pelo risco do aparecimento de resistência, que é muito mais presente no universo dos antivirais e antibacterianos, mas que já começa a aparecer relatos quanto aos antifúngicos.

Devido a esse risco, torna-se quase uma necessidade a busca por novas moléculas e novos mecanismos de ação nos tratamentos antimicrobianos. Caminhando paralelo a esse fator, temos a pesquisa envolvendo produtos naturais, que é uma enorme fonte de moléculas e esqueletos moleculares, que podem dificultar a resistência antimicrobiana por atuarem em conjunto devido a associações (como, por exemplo, extratos vegetais) ou graças à alta complexidade estrutural.

O uso de fitoterápicos na forma de chás, garrafadas, banhos, cataplasmas está inerente na história e evolução da humanidade. As plantas têm sido uma fonte inesgotável e gigantesca de substâncias que estão presentes em grande parte dos medicamentos mais utilizados.

A enorme biodiversidade vegetal no Brasil aliada ao conhecimento da medicina indígena e o uso cultural que foi passado através das gerações, tornam-se uma enorme fonte de informações e hipóteses a serem exploradas por pesquisadores. A alta biodiversidade possibilita pesquisas abrangendo diversas áreas não apenas ligadas ao uso medicinal, como também à nutrição, ecologia, engenharias e biotecnologia.

Seguindo o que acontece em diversos outros países, os principais órgãos de saúde brasileiros (ANVISA e Ministério da Saúde) vêm, na última década, começando a incentivar o uso de medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais. Esses estímulos vêm

por meio da padronização na manipulação e na garantia da qualidade, da segurança e eficácia de drogas vegetais e medicamentos fitoterápicos.

O Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica vem trabalhando há tempos com a planta *Piper umbellatum*, conhecida tradicionalmente como pariparoba ou caapeba, estudando a atividade antifúngica frente aos dermatófitos *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*, buscando esclarecer e compreender certos aspectos dessa atividade, visando sempre agregar maior conhecimento na área, almejando o desenvolvimento de futuros medicamentos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Dermatófitos

A dermatofitose é uma das micoses superficiais mais incidentes do mundo causada por um grupo de fungos queratinofílicos denominados dermatófitos e afetam tecidos queratinizados como pele, pelos ou unhas de mamíferos causando infecções superficiais. (CARRILLO-MUNOZ *et al.*, 2004). A infecção geralmente é cutânea e restrita à camada córnea, devido à incapacidade do fungo de penetrar em tecidos profundos ou órgãos de indivíduos imunocompetentes (AQUINO *et al.*, 2007).

Embora essas desordens não sejam sérias em termos de mortalidade, danos físicos e/ou psicológicos, elas têm significativa consequência clínica, com lesões crônicas, de difícil tratamento, além de problemas estéticos (PEREA *et al.*, 2000). O local e gravidade da infecção dependem do microorganismo responsável e da resposta imune do hospedeiro. A doença é nomeada pela região afetada (*Tinea capitis* – cabeça; *Tinea facial* – face; *Tinea corporis* – corpo; *Tinea pedis* – pé) (CARRILLO-MUNOZ *et al.*, 2004).

A atual classificação dos dermatófitos é relacionada à morfologia dos esporos, onde são reconhecidos três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*

(EMMONS, 1934 EMMONS, 1934). São divididos em espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas de acordo com seu habitat primário (AJELLO, 1960).

O desenvolvimento de dermatofitoses na pele facial geralmente apresenta sinais como manchas vermelhas circulares, micoses (“ringworm”), mas formas atípicas da doença foram relatadas mimetizando dermatites seborréicas, de contato, infecções bacterianas, impetigo, pitíriase alba e lúpus eritematoso (ATZORI *et al.*, 2012). Há relatos de um caso clínico em que um paciente neonato teve o diagnóstico diferencial inicial incluindo lúpus neonatal, sífilis secundária, eritema multiforme, entre outros, enquanto uma infecção dermatofítica foi excluída inicialmente devido à idade do paciente (ATANASOVSKI *et al.*, 2011).

A formação de abscessos e ulceração, causados pela implantação subcutânea ou cutânea muito profunda, é rara nas dermatofitoses e geralmente limitada a casos de imunossupressão, o que se tornou uma preocupação atual com o aumento de usuários de drogas e portadores do vírus HIV (GONG *et al.*, 2007). O nome dado a essa manifestação clínica causada por dermatofitose é granuloma de Majocchi (VOISARD *et al.*, 1998).

Uma das formas da doença é a *Tinea capitis*, infecção dermatofítica do talo do pelo do couro cabeludo. Na forma *endothrix*, causada pelo gênero *Trichophyton* apenas, as hifas crescem exclusivamente dentro do pelo e a cutícula se mantém intacta, enquanto na infecção *ectothrix*, geralmente causada pelo gênero *Microsporum*, as hifas invadem a parte medial do folículo piloso e crescem para fora, destruindo a cutícula formando uma bainha externa envolvendo o pelo (REBOLLO, 2008, DA SILVA RODRIGUES *et al.*, 2008).

Durante a infecção, artroconídios aderem à pele do hospedeiro e, após germinação, as hifas do fungo digerem a queratina presente nos tecidos em pequenos

peptídeos e aminoácidos para serem assimilados (MONOD, 2008). Um dos mecanismos iniciais inclui excreção de sulfitos, um agente redutor que age nas pontes dissulfídicas de cistinas, que são responsáveis pela natureza resistente da queratina, permitindo posteriormente a ação de endo e exoproteases secretadas pelo fungo nas proteínas reduzidas (LÉCHENNE *et al.*, 2007).

Apesar de muitas proteases terem sido identificadas e serem o principal alvo de pesquisas para o entendimento dos mecanismos de infecção, seu papel ainda deve ser explorado e o entendimento dos mecanismos de invasão por dermatófitos ainda permanece meramente especulativo (BALDO *et al.*, 2012b).

*T. rubrum* é o agente etiológico mais comum das dermatofitoses sendo encontrado em quase todo o mundo, sendo o mais isolado em casos clínicos tanto nas Américas do Norte e do Sul (incluindo Brasil) como na Europa central (SEEBACHER *et al.*, 2008, SOUZA *et al.*, 2010). Em um estudo de Aquino *et al.* (2007), em Porto Alegre foram registrados mais de dois mil casos de dermatofitoses em 8 anos, 62,2% sendo por *T. rubrum*.

*T. rubrum* 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 artrosporadas. O tempo de crescimento das colônias é intermediário (12-16 dias). As colônias possuem aspecto cotonoso e branco, tornando-se posteriormente aveludadas, com pregas radiais, formando uma pequena saliência no centro. O reverso da colônia e as bordas apresentam pigmentação avermelhada. A microscopia óptica revela microconídios regulares e piriformes, com 2-3 x 3-5 µm de tamanho e produzem raros macroconídios (LACAZ *et al.*, 2002, SIDRIM&MOREIRA, 1999).

*T. rubrum* é capaz de expressar adesinas que reconhecem manose e galactose e que podem estar ligadas à aderência do fungo durante o processo infeccioso (ESQUENAZI *et al.*, 2004 ). Um mecanismo de defesa descrito para esse dermatófito é a capacidade de produzir clamidoconídios quando exposto a agentes tóxicos, favorecendo assim a resistência e a possibilidade de uma reinfecção (GHAHFAROKHI *et al.*, 2004 ).

*Microsporium canis*, um dermatófito zoofílico, foi descoberto ser o mais comum agente causador da tinea capitis na Europa (GINTER-HANSELMAYER *et al.*, 2007). *M. canis* é predominantemente associado a gatos, mas também pode ser encontrado em todos os tipos de mamíferos (CHERMETTE *et al.*, 2008, BALDO *et al.*, 2008).

As colônias de *M. canis* se desenvolvem bem em ágar Sabouraud, apresenta textura algodonsa com discreto relevo umbilicado, de cor branca. A superfície da colônia é plana ou com ranhuras espaçadas e borda radiada. O reverso da colônia apresenta coloração amarelo ou marrom-claro. Os macroconídios são numerosos, fusiformes verrucosos, de paredes grossas e inúmeras septações, que variam de 5 a 7 septações, podendo chegar a 15. 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, SIDRIM&MOREIRA, 1999).

Abordagens genômicas para estudos dos mecanismos de virulência deste grupo de fungos ainda são novos. Alguns trabalhos relatam a existência de genes especializados que atuam no estabelecimento da infecção e resposta adaptativa.

Um dos fatores considerados decisivos para a invasão do extrato córneo por dermatófitos são as enzimas proteolíticas (MONOD, 2008). Entre essas proteases, destaca-se a família chamada subtilisina. A Sub3 demonstrou ser necessária na

aderência de artroconídeos na pele de felinos (BALDO *et al.*, 2008, BALDO *et al.*, 2010, DESCAMPS *et al.*, 2002). Posteriormente foi demonstrado um precursor da Sub3 que age como inibidor da mesma por competição seletiva. Porém os fungos são capazes de secretar proteases que agem nesse precursor e limitam o uso de inibidores peptídicos por serem capazes de clivá-los (BALDO *et al.*, 2012a).

Além das subtilisinas, foram descritas cinco tipos de fungalisinas (JOUSSON *et al.*, 2004) e duas dipeptidilproteases (Dpp) (VERMOUT *et al.*, 2007) e leucina aminopeptidases (Lap) da família M28 em *T. rubrum* (MONOD *et al.*, 2005). Dentro da família de fungalisinas, algumas metaloproteases com atividade queratinolítica foram identificadas (BROUTA *et al.*, 2001, BROUTA *et al.*, 2002). Não foi detectada transcrição gênica de fungalisinas em artroconídios e não houve diferença de expressão de Dpp entre cepas isoladas de gatos saudáveis e infectados (MATHY *et al.*, 2010). Laps e DppIV demonstraram, em outros modelos, atuar sinergicamente ao digerir os peptídeos gerados pelas endoproteases. Foi descrita também a produção de ceramidases por *T. rubrum* (GIDDEY *et al.*, 2007).

Recentemente, MARTINEZ *et al.*, 2012 sequenciaram por *shotgun* o genoma de cinco espécies de dermatófitos, incluindo *T. rubrum* e *M. canis* comparando-os, inclusive com outros fungos. Foram identificadas proteases (incluindo subtilisinas); pseudoquinases, metabólitos secundários e domínios de ligação LysM (capazes de se ligarem à quitina e mascarar a parede celular e impedindo a estimulação da resposta imune do hospedeiro) enriquecidos em número de genes.

Em outro estudo, *M. canis* e *Arthroderma benhamiae* foram cultivados em meios à base de proteínas em pH ácido. A análise por *Shotgun* MS das proteínas revelou novas proteases secretadas por dermatófitos em pH ácido, tal como pepsinas, sedolisinas e

carboxipeptidases ácidas, sugerindo assim a existência de diferentes vias de degradação de proteínas por esses fungos (SRIRANGANADANE *et al.*, 2011).

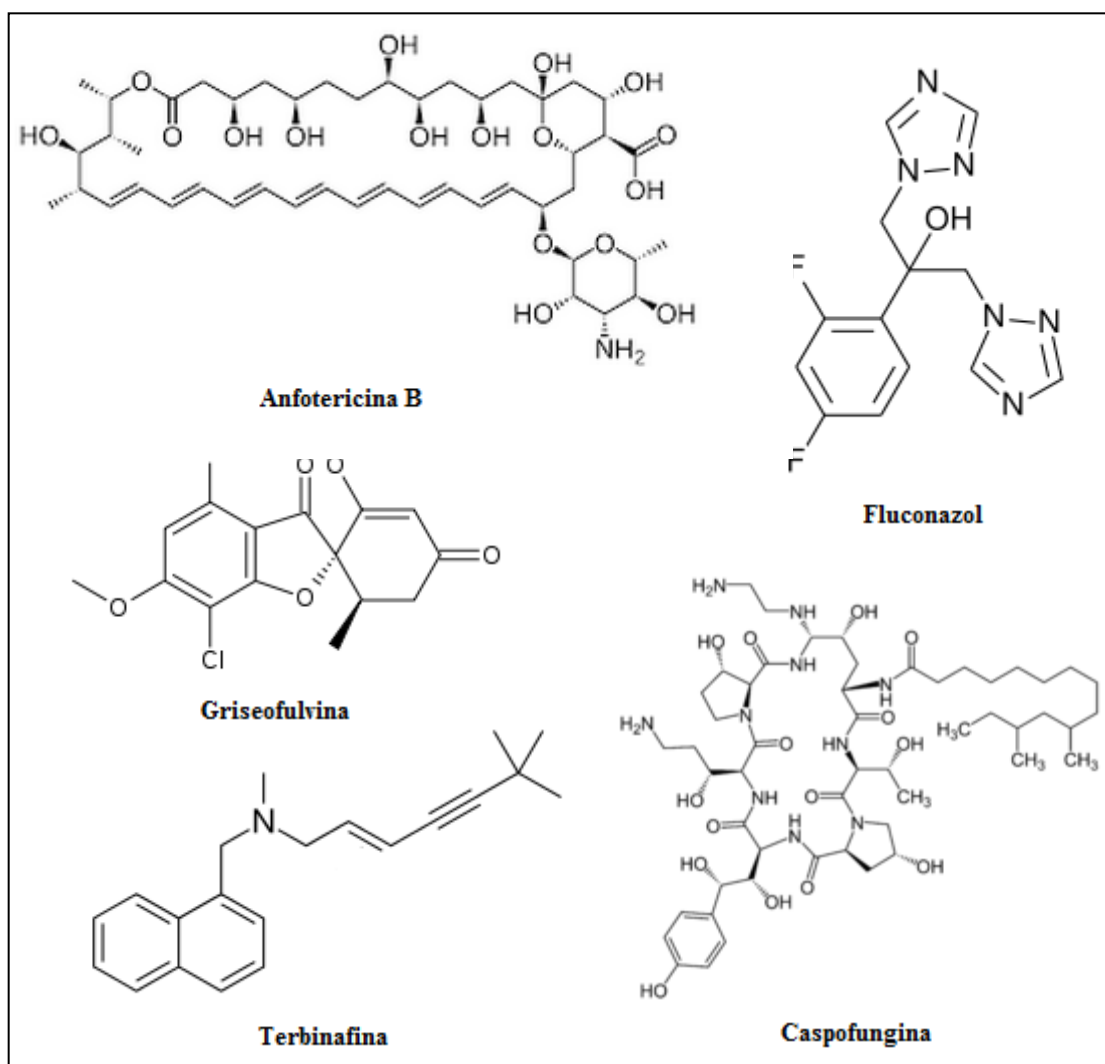
CHEN *et al.*, 2010, estudaram a diferença de expressão das endoproteases de *T. rubrum* incubados em meios contendo queratina de diferentes origens, demonstrando afinidade de MEP2, SUB5, SUB2 e SUB3 por originária da pele e SUB1, SUB4 e MEP4 por originária da unha, podendo ser uma das causas da adaptação do fungo a diferentes áreas do corpo. Pesquisadores revelaram por hibridação de supressão subtrativa diversos genes novos de *T. rubrum* que podem estar ligados à virulência ou respostas adaptativas expressos apenas em resposta a diferentes condições como diferentes meios de cultura variando a fonte de carbono e variação de pH (BAEZA *et al.*, 2007, MARANHÃO *et al.*, 2007, MARANHÃO *et al.*, 2011, ZAUGG *et al.*, 2009).

O aumento da resistência aos antimicrobianos, em conjunto com o número restrito de drogas antifúngicas disponíveis comercialmente e que ainda apresentam muitos efeitos adversos, são a causa do aumento da morbidade e mortalidade pelas infecções fúngicas. Portanto, há a necessidade de desenvolver antifúngicos novos e mais eficazes e os produtos naturais são protótipos atraentes para esse fim, devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas (NEWMAN&CRAGG, 2007). Os mecanismos de ação de muitas moléculas com atividade antifúngica de fontes vegetais ainda não foram elucidados, sendo assim, a abordagem proteômica é uma estratégia para a descoberta de novos alvos moleculares e de mecanismos de ação (BLACKSTOCK&WEIR, 1999, GYGI *et al.*, 2000).

## **2.2 Antifúngicos**

A pesquisa e o desenvolvimento de antifúngicos é um desafio. Com exceção da parede celular, os fungos são metabolicamente similares às células de mamíferos e portanto, oferecem poucos alvos específicos (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2010).

**Figura 1 – Estruturas químicas dos principais antifúngicos comerciais.**



FONTE: GREGORÍ VALDÉS, 2005

No tratamento de dermatofitoses é fundamental que se conheça as espécies fúngicas causadoras da doença. Para o tratamento das infecções fúngicas de pele, os medicamentos tópicos são apropriados apenas para infecções por fungos antropofílicos em estágios iniciais ou leves. A terapia tópica é pouco eficaz, exceto nas onicomicoses superficiais e melhores resultados são observados quando se associa o tratamento oral ao tópico. Derivados azólicos na forma de cremes podem ser usados e a sua eficácia é aumentada com a retirada da unha (WEITZMAN&SUMMERBELL, 1995,SIDRIM&ROCHA, 2004). Já nas onicomicoses e infecções causadas por dermatófitos zoofílicos, a terapia usual é a sistêmica e os principais fármacos utilizados

no tratamento são terbinafina, itraconazol e griseofulvina (TOSTI *et al.*, 1997, WHITE *et al.*, 2008). Nas onicomicoses e infecções causadas por *T. rubrum*, é comum a recorrência após cessar o tratamento antifúngico (GUPTA&COOPER, 2008).

Os antifúngicos tricíclicos atuam na enzima 14-alfademetilase lanosterol envolvida na biossíntese do ergosterol (MARICHAL&BOSSCHE, 1995). Os polienos representados pela anfotericina B, tem seu mecanismo de ação relacionado com a ligação do composto ao ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana, levando o fungo à morte (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006). As alilaminas representadas pela terbinafina agem inibindo a esqualeno epoxidase envolvida na síntese do lanosterol, que é o precursor do ergosterol (OSBORNE *et al.*, 2006)

A griseofulvina atua desregulando a formação de microtúbulos do fuso e, conseqüentemente, inibe a mitose celular (JORDAN&WILSON, 2004). A griseofulvina é capaz de se acumular em camadas queratinócitas da epiderme (DECARLI&LARIZZA, 1988) e é considerada o padrão ouro para dermatofitose, mas há relatos de resistência a esta droga (CHEN&FRIEDLANDER, 2001, ALVAREZ&SILVERBERG, 2006). Em estudos visando a atuação de diferentes medicamentos presentes no mercado, foram avaliados os tratamentos com três diferentes medicamentos, em 75 pacientes afligidos por *Tinea capitis*; os antifúngicos com maiores taxas de cura foram, respectivamente, griseofulvina, terbinafina e fluconazol (GROVER *et al.*, 2012). BAO *et al.*, 2013 determinaram a concentração efetiva mínima de caspofungina e micofungina para 82 cepas de dermatófitos, a primeira apresentando valores de inibição de 1 µg/mL contra *T. rubrum*, *T. violaceum* e *T. tonsurans* e 0.5 µg/mL para *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum* e *T. verrucosum*, enquanto a micafungina apresentou valores de 0.06 µg/mL para *M.*

*canis* e *Trichophyton verrucosum* e 0.03 µg/mL *T. rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*.

O ciclopirox é um agente fungicida frente aos dermatófitos que atua na inibição de metaloenzimas responsáveis pela degradação de peróxidos (SUBISSI *et al.*, 2010).

Em estudo recente, GHELARDI *et al.*, 2014) relataram o isolamento de mutantes de *T. rubrum* espontaneamente resistentes a terbinafina, itraconazol e amorolfina, bem como testou a geração de resistência do fungo quando exposto a subdosagens prolongadas das drogas comerciais, demonstrando que o mutante obtido após exposição a terbinafina, teve o valor de CIM aumentado em 500-1000 vezes contra a mesma droga.

### 2.3 *Piper umbellatum* L. Miq. (Piperaceae)

*Piper umbellatum* L. Miq. é uma planta pertencente à família Piperaceae. É encontrada de Norte a Sul no Brasil sendo frequente na Amazônia e nas horlas de Mata Atlântica e outras regiões da América Latina, como Peru e México (PECKOLT, 1941, YUNKER, 1973).

*P. umbellatum* foi incluída inicialmente à Farmacopeia Brasileira pelo nome científico *Heckeria umbellata* (L.) Kunth, mas responde também pelas sinônimas *Pothomorphe umbellata* L. Miq., *Peperomia umbellata* (L.) Kunth, *Peperidia umbellata* (L.) Kostel., *Piper cuernavacatum* C. DC., *Piper postelsianum* Maxim., *Pothomorphe dombeyana* Miq., *Pothomorphe subpeltata* (Willd.) Miq. e *Lepianthes umbellata* (L.) Raf. ex Ramamoorthy (The plant list, 2013).

*Piper umbellatum* L. e a espécie do mesmo gênero *Piper peltatum* L. (*Pothomorphe peltata* L.) são conhecidas popularmente por caapeba, pariparoba, malvaíscó, capeva, caapeba-do-norte, caapeba-verdadeira (Figura 1). O nome pariparoba deriva do Tupi e significa amargo, que acaba com as feridas (MORAES *et*

*al.*, 1987). As duas espécies têm sido utilizadas na medicina popular como analgésico, diurético e agente anti-espasmódico, desordens inflamatórias, malária, asma e doenças gastrintestinais (AMORIM *et al.*, 1988).

**Figura 2 – Exemplar de *Potomorphe umbellatum* cultivado no Jardim de Plantas Medicinais na Faculdade de Ciências Farmacêuticas**



**Fonte:** Arquivo pessoal.

*P. umbellatum* é uma planta de porte subarbustivo perene que mede de 1 a 3 m de altura. As folhas são grandes, arredondadas, rugosas com margens inteiras, com ápice subagudo e base codiforme medindo entre 14-14 cm de comprimento e 17-25 cm de largura possui pecíolo sulcado longitudinalmente puberulento e terminando em bainha alargada (REITZ, 1970, MORAES *et al.*, 1987). Apresenta multicaule com ramos angulosos e nodosos variando entre verde claro e verde acinzentado. Apresenta inflorescências axilares com pedúnculo único de 10-15 cm de comprimento, formando espigas 6-9 cm dispostas em umbelas. As raízes são adventícias fasciculadas, de cor pardacenta, lenhosa, tortuosa, estriada longitudinalmente com saliências verrucosas e medem de 10 a 15 cm por 5 mm a 3 cm de diâmetro (SILVA, 1926). A espécie pertence

ao grupo das esciófitas, isto é, plantas de sombra obrigatória (LORENZI&DE ABREU MATOS, 2002).

Em estudos de determinação do perfil químico de *P. umbellatum* foram isolados e identificados diferentes compostos, sendo o principal metabólito secundário o 4-nerolidilcatecol (4NC), um derivado sesquiterpênico que pode ser extraído de todas as partes da planta e a que foi atribuído a maioria das atividades terapêuticas (KIJOA, 1980).

Os estudos fitoquímicos realizados anteriormente demonstraram a presença de esteroides (sitosterol e estigmasterol) isolados de todos os órgãos da planta, bem como o 4-nerolidilcatecol, principalmente a partir de folhas e caule nos extratos hexânicos e diclorometânicos, além do peltatol A, um dímero do 4-nerolidilcatecol (GUSTAFSON *et al.*, 1992). No óleo essencial foram encontrados sesquiterpenos como o  $\delta$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -guaieno, *trans*-cariofileno, tetrametilríciclo undec-1-eno,  $\alpha$ -humuleno, epibiciloesquifenantreno,  $\alpha$ -selineno,  $\gamma$ -cadieno,  $\beta$ -patchuleno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\delta$ -cadieno,  $\gamma$ -gurjuneno,  $\alpha$ -ylangeno, cadieno e nerolidol (JANUÁRIO, 1994). PERAZZO, 2006 encontrou na fração diclorometanólica do extrato hidroetanólico (70%) o oxiranemetanol, 4-nerolidilcatecol, hinoquinina, fitoesteróides como campesterol, estigmaterol e  $\beta$ -sitosterol. MESQUITA *et al.*, 2005, encontrou em seu estudo óleos essenciais com a presença de *trans*-cariofileno,  $\delta$ -cadieno, *trans*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, germacreno D, bicilogermacreno, elemol,  $\beta$ -pipeno. BALDOQUI, 2009 no estudo fitoquímico das folhas de *P. umbellatum*, isolou onze substâncias, sendo duas amidas (arboreumina e arboreumina glicosilada), cinco flavonas (vitexina 2-O- $\beta$ -glucopiranosídeo, apigenina 8-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, orientina 8-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavona e velutina), duas lignanas

(sesamina e diidrocubebina), um fenilpropanóide (ácido *p*-cumárico) e 4-nerolidilcatecol.

O extrato etanólico da planta demonstrou atividade antioxidante maior que o 4NC purificado (ROPKE *et al.*, 2003). Posteriormente foi demonstrada proteção contra radiação UV (ROPKE *et al.*, 2005) e inibição de metaloproteases MMP-2 e MMP-9, responsáveis por induzir carcinogênese, incitando a uma proposta de aplicação para cosméticos contra o envelhecimento cutâneo e como protetor solar (ROPKE *et al.*, 2006). Foi evidenciado que o efeito de inibição de MMP-2 e MMP-9 pelo extrato de *P.umbellatum* se manteve em modelo de indução por queima alcalina da córnea de coelhos (BARROS *et al.*, 2007). A atividade anti-inflamatória foi demonstrada em modelo de inflamação induzida em ratos (PERAZZO *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante do 4NC por permitir a possibilidade de captação de radicais livres, é capaz de inibir o dano genético provocado por ciclofosfamida (VALADARES *et al.*, 2007). Em estudo de BROHEM *et al.*, 2009, o 4NC demonstrou a capacidade de induzir apoptose em melanoma, provavelmente pela diminuição de MMP-2 e impedir o crescimento em G1 do ciclo celular.

Entre os testes toxicológicos, o extrato etanólico de *P. umbellatum* demonstrou baixa toxicidade subcrônica em ratos quando administrado oralmente (BARROS *et al.*, 2005). O potencial mutagênico do extrato hidroetanólico (70 %) foi avaliado em ratos Wistar e a concentração de 1500 mg/Kg não induziu dano ao DNA em células hepáticas nem na medula óssea (DE ANDRADE *et al.*, 2005). Quando estudada a administração de 4NC pelas vias oral, subcutânea e intraperitoneal em camundongos *Swiss* infectados por *P. berghei* apenas o último caso demonstrou efeito tóxico agudo (ROCHA E SILVA *et al.*, 2011).

Os extratos diclorometânico e etanólico de *P. umbellatum*, bem como suas frações demonstraram atividade citotóxica contra linhagens de células humanas (SACOMAN *et al.*, 2008, LOPES *et al.*, 2012). Um estudo onde os autores demonstraram a atividade antimalárica e a citotoxicidade frente a células humanas do 4NC e de seis derivados, além dos grupamentos catecol e nerolidil, e indicaram que a citotoxicidade do 4NC é inerente ao grupo catecol (PINTO *et al.*, 2006). Ainda, estudos com células KB indicaram que a atividade tóxica capaz de diminuir o crescimento celular pode estar relacionada à inibição da topoisomerase I causada pelo 4NC extraído de *P. peltata* (MONGELLI *et al.*, 1999).

A atividade antimicrobiana foi demonstrada para o extrato hidroetanólico 70% e frações frente a *T. rubrum* (RODRIGUES *et al.*, 2012). Em outro estudo, a atividade do extrato hidroetanólico 70% foi maior que do 4NC, ambos com valores de CIM abaixo de 100 µg/mL, frente a *Candida albicans*, *C. glabrata*, e *C. kruzei*, mas não frente a *Cryptococcus neoformans* e a cepa resistente de *Staphylococcus aureus* (BAGATELA *et al.*, 2013). Recentemente, o extrato hidroetanólico 75% foi testado frente a diferentes bactérias, e demonstrou CIM igual ou próxima à do cloranfenicol para *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Enterococcus faecalis*, mas baixa atividade frente a *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus epidermidis* (DA SILVA *et al.*, 2014).

Entre outros metabólitos que demonstraram atividade antimicrobiana, N-benzilmescalina isolada das partes aéreas de *P. umbellata* demonstrou atividade biológica contra *Helicobacter pylori* (ISOBE *et al.*, 2002). TABOPDA *et al.*, 2008 isolou e identificou quatro alcalóides que nomeou de pirperumbelactanas, sendo que duas demonstraram capacidade antifúngica maior que a do 4NC e dos extratos e subfrações de *P. umbellatum* frente a seis espécies, obtendo atividade antifúngica maior

que os padrões (miconazol e anfotericina B) contra *Aspergillus flavus* e *Trichophyton longifusus*.

Assim, este trabalho tem como objetivo a continuidade do estudo da atividade antifúngica e dos mecanismos de ação dos extratos de *P. umbellatum* e seus derivados, testando seus compostos quanto à atividade e também avaliando-os em relação à citotoxicidade *in vitro*. Foram utilizados isolados clínicos de *T. rubrum* e *M. canis*, procurando identificar algumas proteínas-alvo decorrentes do efeito antifúngico no proteoma das linhagens após contato com os extratos da planta em estudo.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos extratos de *P. umbellatum* e seus derivados e identificar as substâncias promotoras dessa atividade, bem como os mecanismos de ação responsáveis por tal atividade.

Os objetivos específicos envolvidos nessa busca foram:

- Estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico e o isolamento do 4NC
- Estudo biodirigido para determinar a atividade antifúngica de extratos de *P. umbellatum* e seus derivados frente aos fungos *M. canis* e *T. rubrum*
- Avaliar a atividade antifúngica do 4NC frente às espécies *M. canis* e *T. rubrum*.
- Estudar os mecanismo de ação antifúngica dos extratos, através dos testes de interação com sorbitol e ergosterol de frações e substâncias isoladas de *P. umbellatum*.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato de *P. umbellatum*, frações e substâncias isoladas.

- Avaliar o secretoma de *M. canis* após tratamento com 4NC por SDS-PAGE comparativo.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Equipamentos

Autoclave vertical (FABBE)

Bico de Bunsen

Bomba de ar comprimido/vácuo (Primatec)

Cabine de segurança microbiológica com fluxo laminar (Veco)

Câmera fotográfica digital (Nikon Coolpix S3300)

Cartuchos de C18 (500mg) Agilent para extração em fase sólida

Coluna analítica para CLAE Hypersil Gold<sup>®</sup> C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)

Coluna semipreparativa para CLAE Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm x 7 µm, Zorbax)

Cromatofolhas para cromatografia com sílica gel 60 fluorescência 254 nm, 20x20 cm em alumínio (Merck)

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer Flexar, modo analítico e preparativo, constituído por Bomba quaternária, degaseificador, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> de 6 pórticos com “loop” de 20 µL, detector UV/VIS, programa gerenciador de dados Chromera<sup>®</sup> 4.1.0.6386 (Multiusuário)

Cuba para eletroforese (Amershan “ECL” Gel box)

Espectrofotômetro mod UV M51 (Be)

Espectrômetro RMN BRUKER Fourier 300, 7 Tesla (Multiusuário – Instituto de Química)

Estufas de ativação e revelação para CCD, secagem de materiais e de incubação

Filtro para esterilização (Merck)

Fonte de eletroforese (GRS 3000 STD)

Incubadora com agitação Mod T 422 (TECNAL)

Membrana de filtração 0,22 µm PVDF

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

Peagômetro B374 Micronal

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

Placa de microdiluição de 96 poços (TPP)

Rotaevaporador Fisatom

Vidrarias: Placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas, balão de vidro, balão volumétrico, provetas, béquer, bastão de vidro, erlenmeyers, funil de vidro, cuba para revelação da eletroforese, placa de vidro para cromatografia, Cuba de vidro para cromatografia, colunas cromatográficas de vidro de diferentes larguras e comprimentos, seringas de vidro, balão de fundo redondo, condensador.

#### ***4.2 Solventes, reagentes e meios de cultura***

Acetato de etila (Vetec)

Acetona (Synth)

Ácido acético (Qhemis)

Ácido sulfúrico (Synth)

Acido tricloroacético (JT Baker)

Acrilamida (Sigma)

Agarose (Life technologies)

Água bidestilada

Água deionizada

Água ultrapura (Millipore)

Alamar Blue TM

Álcool etílico (Vetec)

Álcool metílico (Vetec)

Álcool metílico grau HPLC (Merck)

Aldeído anísico (Vetec)

Anfotericina B (Sigma)

Azul de bromofenol (Synth)

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

Cloreto de sódio (JT Baker)

Diclorometano (Vetec)

DMSO (Vetec)

Dodecil Sulfato de Sódio – SDS (JT Backer)

Ergosterol (Fluka)

Fluconazol (Sigma)

Formaldeído (Qhemis)

Gel Amershan 12%

Glicina (Dinamica)

Glicose – Dextrose (Synth)

Griseofulvina (Sigma)

Hexano (Qhemis)

Hidróxido de potássio (Meck)

Hidróxido de sódio (Vetec)

Marcadores de Peso Molecular para eletroforese (Invitrogen)

Meio de cultura batata dextrose ágar (Acumedia)

Meio de cultura caldo batata dextrose (Acumedia)

Meio RPMI 1640 (Sigma)

MOPS - ácido 3-(Nmorfolino) propanosulfônico (Acros Organics)

Reagente de Bradford (Sigma)

Resazurina (Vetec)

Sorbitol (Difco)

Temed (JT Baker)

Terbinafina (Sigma)

Tris base - alfa, alfa, alfa-Tris (hidroximetil) Metilamina, Tris (hidroxidi metil amino metano (JT Baker)

Tris HCl (Sigma)

### **4.3 Soluções**

#### **A) Anisaldeído sulfúrico**

0,5 mL anisaldeído (aldeído anísico)

10 mL ácido acético glacial

85 mL metanol

5mL ácido sulfúrico concentrado

#### **B) RPMI 2% glicose**

RPMI 1640 \_\_\_\_\_ 10,4g

MOPS Purificado \_\_\_\_\_ 34,53g

Glicose \_\_\_\_\_ 20g

Água destilada qsp \_\_\_\_\_ 1L

Ajustar o pH para 7.0 e esterilizar por filtração

#### **C) Tampão de corrida 10X**

Tris \_\_\_\_\_ 250mM \_\_\_\_\_ 30,3g

Glicina \_\_\_\_\_ 1,92M \_\_\_\_\_ 144,13g

SDS \_\_\_\_\_ 1% \_\_\_\_\_ 10g

Água MilliQ qsp 1L

Dissolver o Tris e a Glicina a quente e somente após a dissolução completa adicionar o SDS.

#### **D) Tampão de amostra**

A 6g de ureia, adicionou-se 4mL de água milliQ e a suspensão foi esquentada em banho maria a 56°C até total dissolução. Em seguida adicionou-se 0,2g de SDS, 0,2mL de solução Tris HCl 1M pH6.8, 10mL de glicerina, 0,010g de azul de bromofenol. A solução foi estocada em geladeira. No momento do uso foi adicionado 50µL de 2-mercaptoetanol em 300 µL do tampão.

#### **E) Coloração por Comassie Blue R350**

Foi preparada solução diluída 1:10 com metanol: ácido acético: água destilada 3:1:6 da solução estoque composta por Comassie Blue 0,2% em metanol. A solução descolorante composta de 20% etanol, 5% ácido acético, 75% água.

#### **F) PLAAC 1000X**

Mistura-se 1mL de cada um dos seguintes inibidores: Pepstatina, Leupeptina, Aprotinina, Antipaina, Chymostatina a 1mg/mL diluídos em DMSO. A solução é alíquotada e armazenada a -20°C.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 *Matéria Vegetal*

As partes aéreas moídas de *P. umbellatum* foram adquiridas do Sítio da Mata, Rod. Cajuru / Cassia dos Coqueiros- São Paulo. Lote 05SDM coletado em 16/01/2013. Laudo anexo.

#### 5.1.1 Autenticação da droga vegetal

A autenticação da droga vegetal foi realizada pela análise microscópica anatômica da folha em comparação com a literatura no Laboratório de Botânica com o auxílio do Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento.

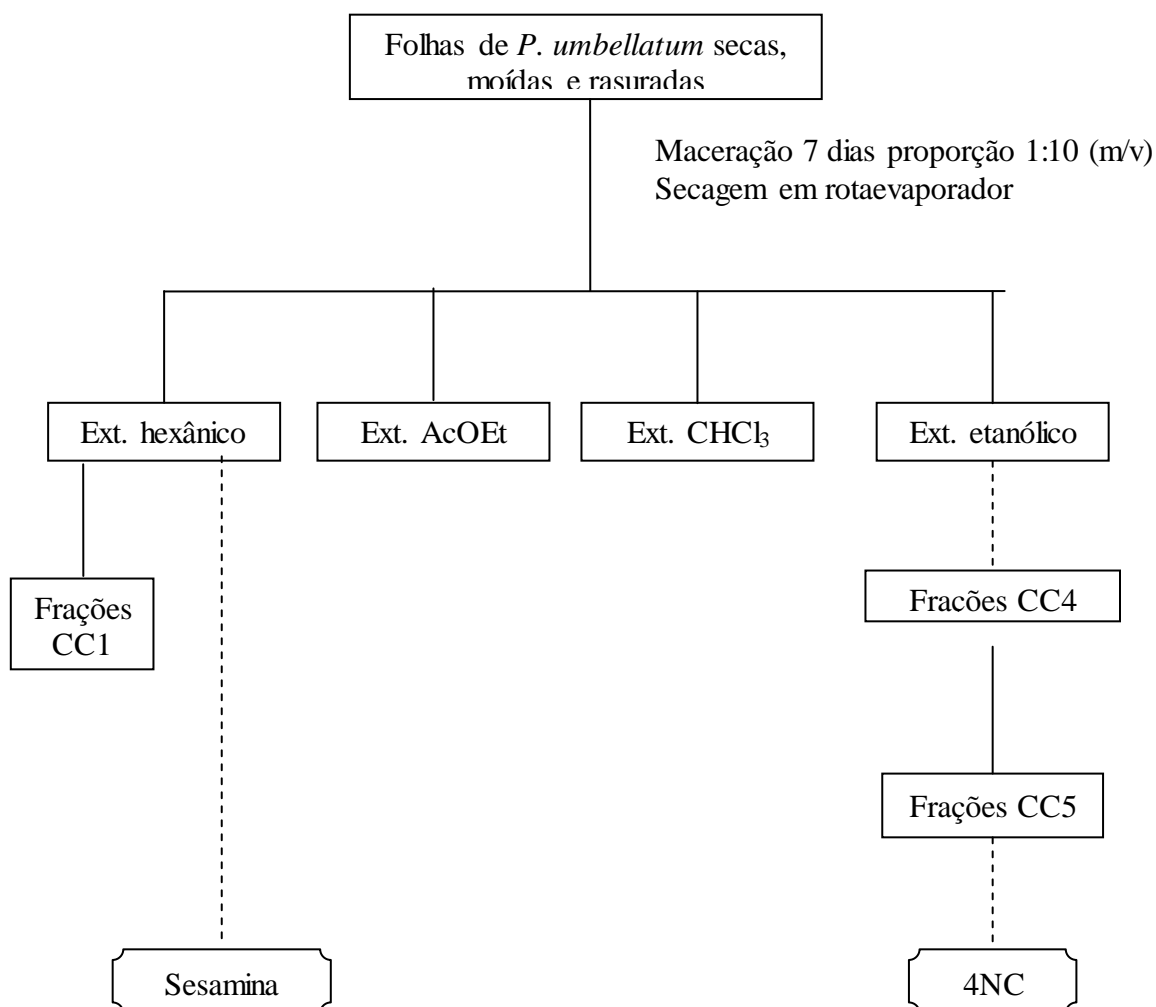
Fragmentos da droga vegetal rasurada (folhas) foram reidratados durante três dias em estufa de 60° em contato com solução água: etanol 96%: glicerina (5:4:1) com adição de 5 gotas de detergente a cada 200mL.

A confecção das lâminas contendo fragmentos das folhas foi realizada conforme protocolo de inclusão em historresina líquida. A desidratação foi realizada sob vácuo mantendo-se os fragmentos em contato com soluções de etanol (70%, 96% e 100%) por duas horas cada. A pré-infiltração foi realizada com solução etanol: resina líquida (1:1) por duas horas sob vácuo. A infiltração foi realizada com pó ativador na concentração de 1% em resina líquida durante 24 horas. Posteriormente, a polimerização foi realizada com solução de infiltração (15mL) e Hardner (1mL) sob agitação. O material emblocado foi seccionado em micrótomo de rotação (10 µm) e afixado em lâminas de vidro e corado com azul de toluidina (pH 6,8) por três minutos, lavado em água desionizada, seco em estufa a 37°C durante 24 horas e coberto por resina Entellan (Merck) e lamínula.

## 5.2 Preparo do extrato e frações

A **Figura 3** traz o fluxograma simplificado demonstrando a origem de cada grupo de frações e substâncias isoladas. A obtenção dos extratos, o fracionamento, isolamento e purificação estão detalhados nos itens descritos na sequência.

**Figura 3 - Fluxograma da obtenção de derivados de *P. umbellatum* avaliados para atividade antifúngica (CIM)**



### 5.2.1 Obtenção dos extratos

Foram obtidos por maceração na proporção de 1:10 (m/v) os extratos hexânico, etanólico, clorofórmio e acetato de etila. Folhas secas e moídas foram maceradas por 7 dias em temperatura ambiente ao abrigo de luz com diferentes solventes. A partir desses foi realizado um estudo biodirigido para definição de quais extratos seriam submetidos a fracionamento.

Para obtenção de extratos visando o estudo dirigido de atividade antifúngica, foram utilizados 50g de droga vegetal para cada solvente. Para obtenção dos extratos para fracionamento, foram utilizados 200g para maceração com hexano e 400g para maceração com etanol.

### **5.2.2 Frações líquido-líquido**

O extrato hexânico seco (4,53g) foi solubilizado em 180 mL de hexano e submetido a partição líquido/líquido três vezes com volume igual de solução MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2, resultando em uma fração hexânica e uma metanólica (**Figura 4**).

O extrato etanólico (36,21g) foi solubilizado em 300 mL de solução metanol/água 8:2 e submetido à partição líquido/líquido três vezes com volume igual de hexano resultando, nas frações hexano e residual/hidrometanólica.

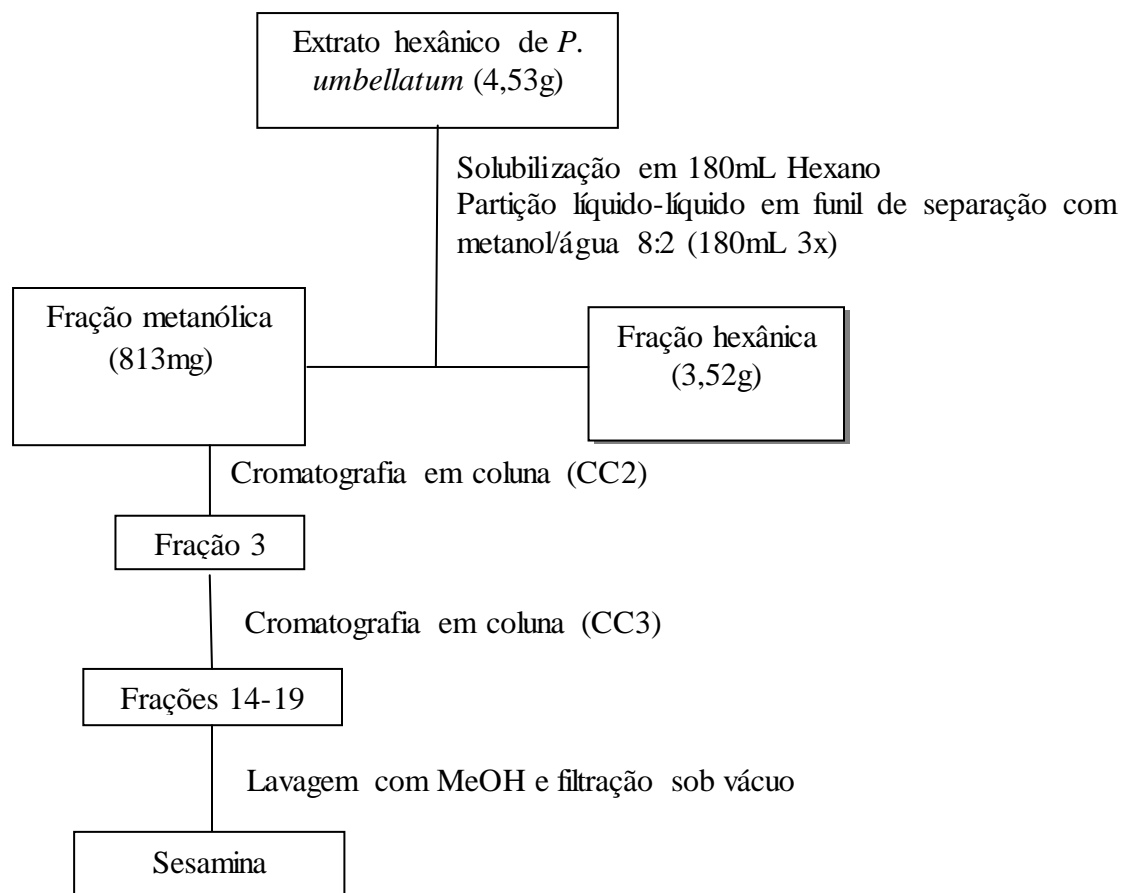
### **5.2.3 Cromatografia em Coluna**

Devido ao número de fracionamentos realizados, as frações foram identificadas por um número representando a sua ordem de saída da coluna, seguido do termo CC (Cromatografia em coluna) e o número da coluna correspondente. Por exemplo, 3CC9 seria a terceira fração coletada durante o fracionamento em coluna de cromatografia número 9.

#### **5.2.3.1 Fracionamento do extrato hexânico**

CC1: O extrato Hexânico (185,5mg) foi submetido a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 15cm x 1,4 cm (63-200 $\mu$ m) empacotada a seco. A amostra foi solubilizada em 1 mL do primeiro eluente e injetada na coluna. A eluição foi realizada sob pressão da gravidade por modo gradiente de concentração, com os eluentes: Hexano 100%; Hex/AcOEt 9:1 ; Hex/AcOEt 8:2; Hex/AcOEt 7:3 ; Hex/AcOEt 6:4 ; Hex/AcOEt 1:1 ; MeOH. Foram coletadas frações a cada 50mL em um total de 15 frações, que foram secas em capela e pesadas.

**Figura 4 – Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico de partes aéreas de *P. umbellatum* por partição líquido-líquido seguida de cromatografia em coluna.**



CC2: A fração metanólica do extrato hexânico HM (813mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica sílica gel 27,5 cm x 1,4 cm (63-200 $\mu$ m) empacotada a úmido. A amostra foi solubilizada em 2 mL do primeiro eluente e injetada na coluna. A eluição foi realizada sob pressão da gravidade por modo gradiente de concentração (Hex/AcOEt 7:3; Hex/AcOEt 6:4 ; Hex/AcOEt 1:1 ; AcOEt/MeOH 1:1; MeOH). Foram coletadas frações a cada 18mL em um total de 21 frações, que foram secas em capela e pesadas..

CC3: A fração 3 da CC4 (278,5mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica em sílica gel 24 x 0,9 cm (40-63 $\mu$ m) empacotada a seco. A amostra foi solubilizada em 0,7 mL do primeiro eluente e injetada na coluna. A eluição

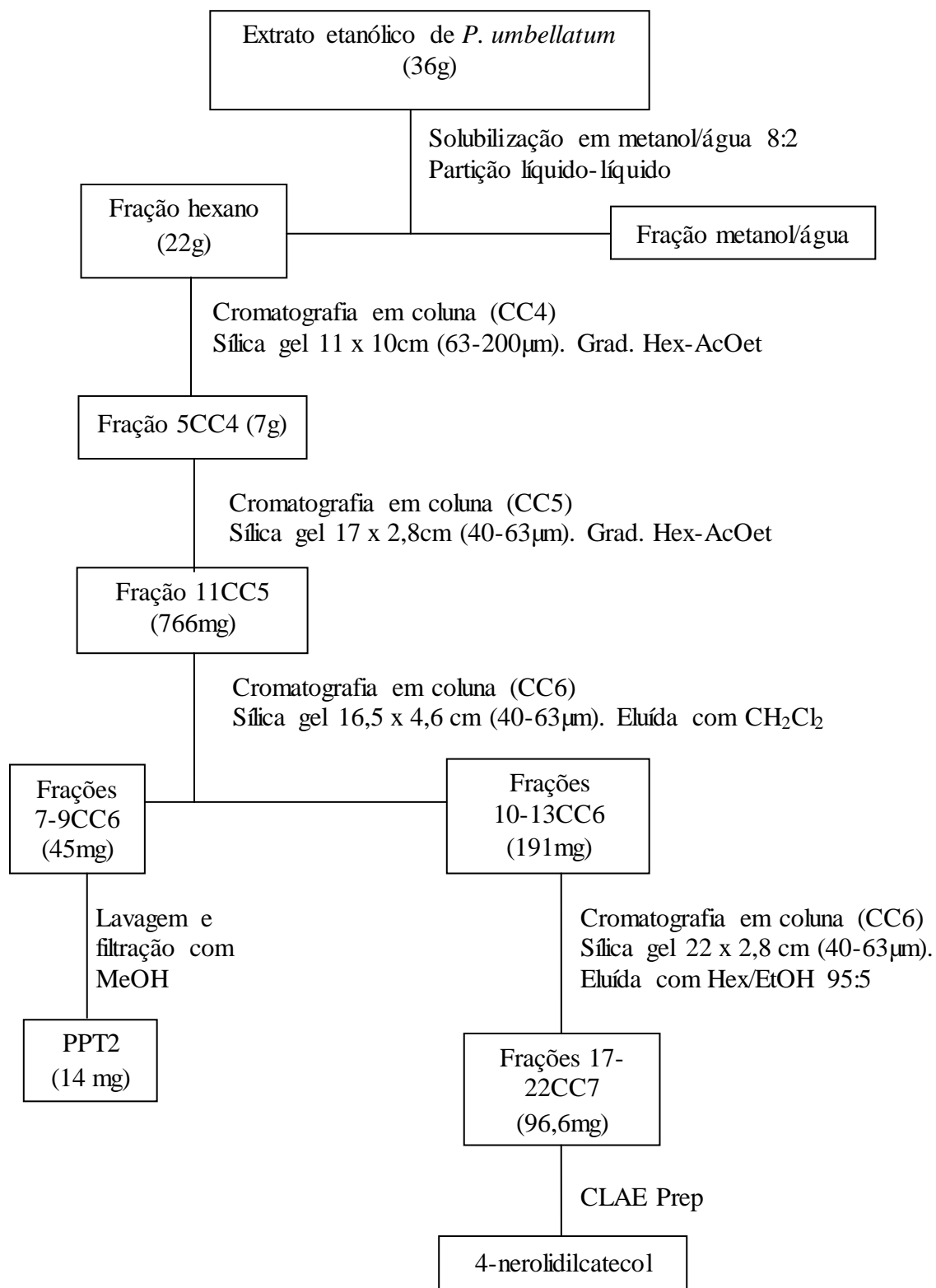
foi realizada sob pressão com ar comprimido por modo gradiente de concentração (Hex/AcOEt 9:1; Hex/AcOEt 8:2 ; Hex/AcOEt 7:3; Hex/AcOEt 6:4; AcOEt 100%; MeOH). Foram coletadas frações a cada 5 mL em um total de 33 frações, que foram secas em capela e pesadas e reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD. A lavagem do grupo de frações 14-19 levou à precipitação da Substância 1, que foi identificada como a sesamina.

#### 5.2.3.2 Fracionamento do extrato etanólico

CC4: A fração hexânica do extrato etanólico de *P. umbellatum* (22g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 11 x 10 cm (63-200 $\mu$ m) empacotada a seco. A amostra foi misturada a massa igual de sílica gel (63-200  $\mu$ m), solubilizada no primeiro eluente e seca em capela, para aplicação sólida. A eluição foi realizada sob pressão reduzida (vácuo) por modo gradiente de concentração: Hex 100%; Hex/AcOEt 9:1 ; Hex/AcOEt 8:2 ; Hex/AcOEt 7:3 ; AcOEt ; MeOH. Foram coletadas frações a cada 750mL em um total de 8 frações, que foram secas em rotaevaporador e pesadas. Essa e as cromatografias em coluna descritas na sequência estão melhor detalhados na **Figura 5**.

CC5: A fração 5 coletada da CC4 (3,5g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 17cm x 3 cm (40-63 $\mu$ m) empacotada a seco. A amostra foi misturada a massa igual de sílica gel (63-200  $\mu$ m), solubilizada no primeiro eluente e seca em capela, para aplicação sólida. A eluição foi realizada sob pressão reduzida (vácuo) por modo gradiente de concentração: Hex ; Hex/AcOEt 9:1 ; Hex/AcOEt 8:2 ; Hex/AcOEt 1:1; MeOH. Foram coletadas frações a cada 50mL, em um total de 18 frações, que foram secas em capela e pesadas..

**Figura 5- Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de partes aéreas de *P. umbellatum***



CC6: A fração 11 obtida em CC5 (766mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 16,5 cm x 4,6 cm (40-63  $\mu\text{m}$ ) empacotada a seco. A amostra foi misturada a massa igual de sílica gel (63-200  $\mu\text{m}$ ), solubilizada no primeiro eluente e seca em capela, para aplicação sólida. A eluição foi realizada sob pressão com ar comprimido em modo isocrático com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Foram coletadas frações a cada 100mL em um total de 23 frações, que foram secas em capela e pesadas. As frações foram juntadas segundo o perfil em CCD. As frações 7 a 9 formaram um precipitado quando lavadas com MeOH que chamamos de PPT2, conforme exemplificado na **Figura 5**.

CC7: As frações 10-13 obtidas em CC6 foram reunidas (191mg) e submetidas a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 15 cm x 1 cm (40-63  $\mu\text{m}$ ) empacotada a seco. A amostra foi misturada a massa igual de sílica gel (63-200  $\mu\text{m}$ ), solubilizada no primeiro eluente e seca em capela, para aplicação sólida. A eluição foi realizada sob pressão com ar comprimido com 300 mL de solução Hex/EtOH 95:5 e lavada com 100 mL de Hex/EtOH 1:1. Foram coletadas frações a cada 15 mL em um total de 24 frações, que foram secas em capela e pesadas.. As frações 17 e 18, 19-22 foram consideradas semelhantes após análise em CCD, reunidas e submetidas a CLAE analítico e depois preparativo para isolamento da substância 2 (4NC), conforme demonstrado na **Figura 5**.

### 5.3 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

Após cada fracionamento efetuado, analisou-se o perfil cromatográfico das frações. As análises em CCD foram realizadas em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck® (10-20 x 20 cm x 0,25 mm) ou cromatofolhas de alumínio Merck, utilizando como fase móvel Hex/AcOEt (7:3, v/v, 100,0 mL) e aplicação de 6-7,5 $\mu\text{L}$  das

amostras com micropipeta (5,0-10,0 mg/mL, AcOEt) e anisaldeído sulfúrico como revelador.

#### **5.4 Pré-tratamento das amostras para CLAE**

As amostras submetidas à CLAE analítico ou preparativo foram submetidas a “clean up” composto por extração de fase sólida em cartucho de C18 (500mg) com 1 mL da amostra na concentração de 5 mg/mL em solução MeOH/H<sub>2</sub>O 95:5 eluído com 4 mL da mesma solução utilizando-se pressão com ar comprimido. As amostras foram secas em capela, pesadas e posteriormente solubilizadas em solução MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20 e filtradas em membrana de PVDF de poro 0,22µm.

#### **5.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As análises e fracionamento foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer Flexar, modo analítico e preparativo, constituído por Bomba quaternária, degaseificador, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> de 6 pórticos com “loop” de 20 µL, detector UV/VIS, programa gerenciador de dados Chromera<sup>®</sup> 4.1.0.6386.

As amostras foram analisadas e o método foi desenvolvido em coluna Hypersil Gold<sup>®</sup> C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm). Injeção de 20 µL na concentração de 3 mg/mL, leitura de absorvância em 254nm.

A amostra foi fracionada no modo preparativo em coluna Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm x 7 µm, Zorbax). Injeção de até 1 mL (em loop de 1 mL) na concentração de 15 mg/mL, leitura de absorvância em 254nm. O método de eluição foi MeOH/H<sub>2</sub>O 85:15 por 45 min sob vazão 8 mL/min. A Substância 2 (4NC) foi coletada com tempo de retenção de 35 min.

## **5.6 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro BRUKER Fourier 300, 7 Tesla, operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Como solvente foram utilizados  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em unidades  $\delta$  (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

## **5.7 Diluição dos extratos vegetais e frações**

Os extratos foram diluídos em DMSO obtendo-se a concentração de 50 mg/mL, sendo posteriormente feita diluição 1:10 com RPMI 1640 para utilização nos testes. 4NC e a fração 11CC5 foram diluídos com RPMI 1640 para a concentração de 625  $\mu\text{g/mL}$ .

## **5.8 Ensaios de atividade microbiológica**

### **5.8.1 Fungos**

Neste trabalho foram utilizados isolados clínicos de *T. rubrum* e *M. canis* cedidos pela professora Dra. Ana Marisa Fusco Almeida do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

A manutenção dos fungos foi realizada por repique semanal em Agar batata dextrose.

### **5.8.2 Preparo do inóculo**

As linhagens de *M. canis* e as de *T. rubrum* foram incubadas em ágar batata a 28 °C por 7 dias. Foram então submetidas a contagem de células em 1mL de salina 0,85 % estéril e diluição em RPMI 1640 para obtenção de inóculo a  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL.

### **5.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Para determinação da CIM foi utilizada a metodologia do CLSI M38-A2 CLSI, 2008. Foi realizada uma diluição seriada (1:1) na própria microplaca de 96 poços, adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  do meio (RPMI 1640) e 100  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas em DMSO. Os poços foram homogeneizados e o volume de 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foi

transferido para a coluna seguinte, e o volume aspirado da última coluna de amostra. Após a diluição seriada, foi adicionado 100 µL do inóculo a  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL. O controle negativo foi constituído apenas de meio de cultura e o controle positivo constituído pela suspensão fúngica e meio de cultivo. A faixa de concentração das amostras variou de 1250 a 9,7 µg/mL e, para a fração 11 e 4NC a faixa foi de 156,3 a 1,2 µg/mL. Foram utilizados como controles os antifúngicos anfotericina, fluconazol, griseofulvina e terbinafina, na faixa de concentração de 16 a 0,125 µg/mL.

A determinação da CIM foi realizada por leitura visual após incubação da placa em estufa a 28°C por 4 dias ou até verificar crescimento e também utilizando-se resazurina (0,001 %) como revelador.

#### 5.8.3.1 Interação de ergosterol e sorbitol exógenos

Os objetivos desses estudos são o esclarecimento dos mecanismos de ação dos extratos e frações. Apenas as amostras que apresentaram alta atividade antifúngica (<100 µg/mL) foram submetidos aos testes de mecanismos de ação.

Esta metodologia é uma variação do CIM, mas com a adição de 0,8 mol/L de sorbitol ou 400 µg/mL de ergosterol. O CIM foi determinado sob as mesmas condições descritas anteriormente e realizados em triplicata. Caso a amostra atue se ligando ao ergosterol, a adição de ergosterol exógeno aumenta a quantidade de substrato para a amostra, diminuindo a ligação à célula e, conseqüentemente, diminuindo a atividade antifúngica. O sorbitol atua na estabilização da célula permitindo uma sobrevivência caso a amostra testada atue causando um desequilíbrio osmótico na mesma (DE OLIVEIRA PEREIRA *et al.*, 2013).

### **5.9 Determinação da Citotoxicidade**

A citotoxicidade “*in vitro*” foi realizada frente às linhagens celulares Hep G2 (hepatocarcinoma humano) e MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano). A incubação foi

realizada em microplaca de 96 poços com fundo chato incubando-se em meio DMEM+F10, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h até formação de tapete celular. O meio foi retirado e adicionou-se 100 µL das amostras testadas e a placa foi submetida a incubação por 24 h. A leitura foi realizada em leitor de microplaca Synergy H1 (BioTek®) por fluorescência com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm após 4 h da adição do corante Alamar Blue a 10 % (AHMED *et al.*, 1994).

As amostras sofreram diluições sucessivas 1:1, abrangendo a faixa de 500 a 0,49 µg/mL. Peróxido de hidrogênio a 10% foi utilizado como controle positivo de morte celular.

O cálculo para se estabelecer a porcentagem de viabilidade celular para cada concentração foi feito em Microsoft Office Excel e segundo a equação demonstrada abaixo:

$$\%V = \frac{A}{CN} \times 100\%$$

Onde CN é o valor de absorbância do controle negativo indicando 100 % de viabilidade celular, composto pelo tapete celular e meio de cultura, sem adição de nenhum outro composto e A é o valor de absorbância da amostra.

O cálculo do IC<sub>50</sub> foi realizado através do software GraphPad Prisma através da obtenção da equação da reta em regressão sigmoidal em gráfico log(concentração) x viabilidade.

### ***5.10 Avaliação da alteração no perfil proteico em eletroforese gerada por tratamento com 4NC***

Após *M. canis* ser cultivado em Agar batata por sete dias, realizou-se suspensão das células em salina e contagem em câmara de Neubauer. Foram realizados três inóculos em erlenmeyers contendo 150 mL de caldo batata dextrose de forma que a concentração final fosse 5 x 10<sup>3</sup> UFC/mL em cada. Após 7 dias, um inóculo não foi

tratado, constituindo o controle negativo, outro foi tratado com 1,5mL de DMSO e o último tratado com 4NC (diluído em 1,5mL de DMSO) na concentração de 92x CIM. Após mais 7 dias, os inóculos foram filtrados à vácuo separadamente.

#### **5.10.1 Obtenção de proteínas extracelulares**

Os filtrados, que constituem as proteínas secretadas ou extracelulares, tiveram as proteínas precipitadas com solução TCA 10% solubilizado em acetona 90% (adicionadas ao filtrado na proporção 1:1 v/v) “overnight” sob refrigeração e então centrifugados a 11,5G (11000 rpm) por 15 minutos e lavados três vezes com solução acetona 90% e centrifugados nas mesmas condições. As proteínas foram então solubilizadas em solução Tris 10mM pH 6,8 e submetidas a dosagem.

#### **5.10.2 Obtenção de proteínas intracelulares**

Para obtenção das proteínas intracelulares presentes na massa fúngica, realizou-se congelamento com nitrogênio líquido seguido de pulverização com auxílio de grau e pistilo até obtenção de pó fino. O conteúdo foi suspenso em solução TrisHCl 10mM pH8.8 (proporção 1:1 v/v) acrescido dos inibidores de protease PLAAC 1x e PMSF 1µg/mL e centrifugado a 5000 RPM por 45 minutos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Para precipitação das proteínas, procedeu-se conforme descrito no item Obtenção de proteínas intracelulares .

#### **5.10.3 Dosagem de proteínas**

A dosagem foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Adicionou-se 100µL da amostra a 3mL do reagente de Bradford e realizou-se leitura da absorbância a 595nm. O cálculo da concentração foi realizado através da equação da reta (concentração x absorbância) obtida de curva padrão de concentrações conhecidas (de 50 a 250 µg/mL) de soro albumina bovino.

#### **5.10.4 Análise proteômica**

As proteínas precipitadas intra e extracelulares foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com o sistema Amersham ECL Gel. A corrida foi realizada com tampão composto por 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3. A voltagem utilizada foi de 160V (incluído o tempo de pré-ativação do gel) e a revelação foi realizada por Comassie Blue.

As bandas diferencialmente expressas quando comparados os perfis proteicos após tratamento com DMSO ou 4NC foram recortadas do gel, descoradas e digeridas *in situ* com tripsina e encaminhadas para análise por espectrometria de massa LC-MS/MS em parceria ao Centro de Química de Proteínas FMRP-USP sob a coordenação do Prof. Dr. José César Rosa.

As bandas recortadas foram lavadas com solução acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 0,1 M, pH 7.8 para descoloração do Comassie e remoção de SDS e posteriormente lavadas com acetonitrila pura. As bandas foram secas em SpeedVac e reidratadas em solução em bicarbonato de amônio 0,1M contendo 0,5µg de tripsina (Promega) por 24 horas a 37°C e interrompida pela adição de 5µL de ácido fórmico. Os peptídeos foram extraídos dos géis e dessalinizados em “micro-tips” contendo resina de fase reversa (POROS R2 (PerSeptive Biosystems)).

As amostras foram solubilizadas e submetidas à cromatografia de fase reversa utilizando um sistema nano-HPLC (Shimadzu) e os fragmentos foram analisados em sistema off-line MALDI-TOF-TOF (Axima Performance, Kratos-Shimadzu). Os fragmentos obtidos foram submetidos ao programa MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). e pesquisados contra o banco de dados SwissProt. As sequências obtidas foram blastadas pela base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) para identificação por pareamento com sequências conhecidas

de proteínas. A sequência FASTA das proteínas identificadas foram comparadas às proteínas descritas em dermatófitos através do *blastp* BroadInstitute (<http://www.broadinstitute.org/>), que se trata de uma base de dados mais completa para fungos.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Autenticação da droga vegetal

A **Figura 6** nos permite autenticar a droga vegetal através da comparação da análise anatômica em comparação com a literatura.

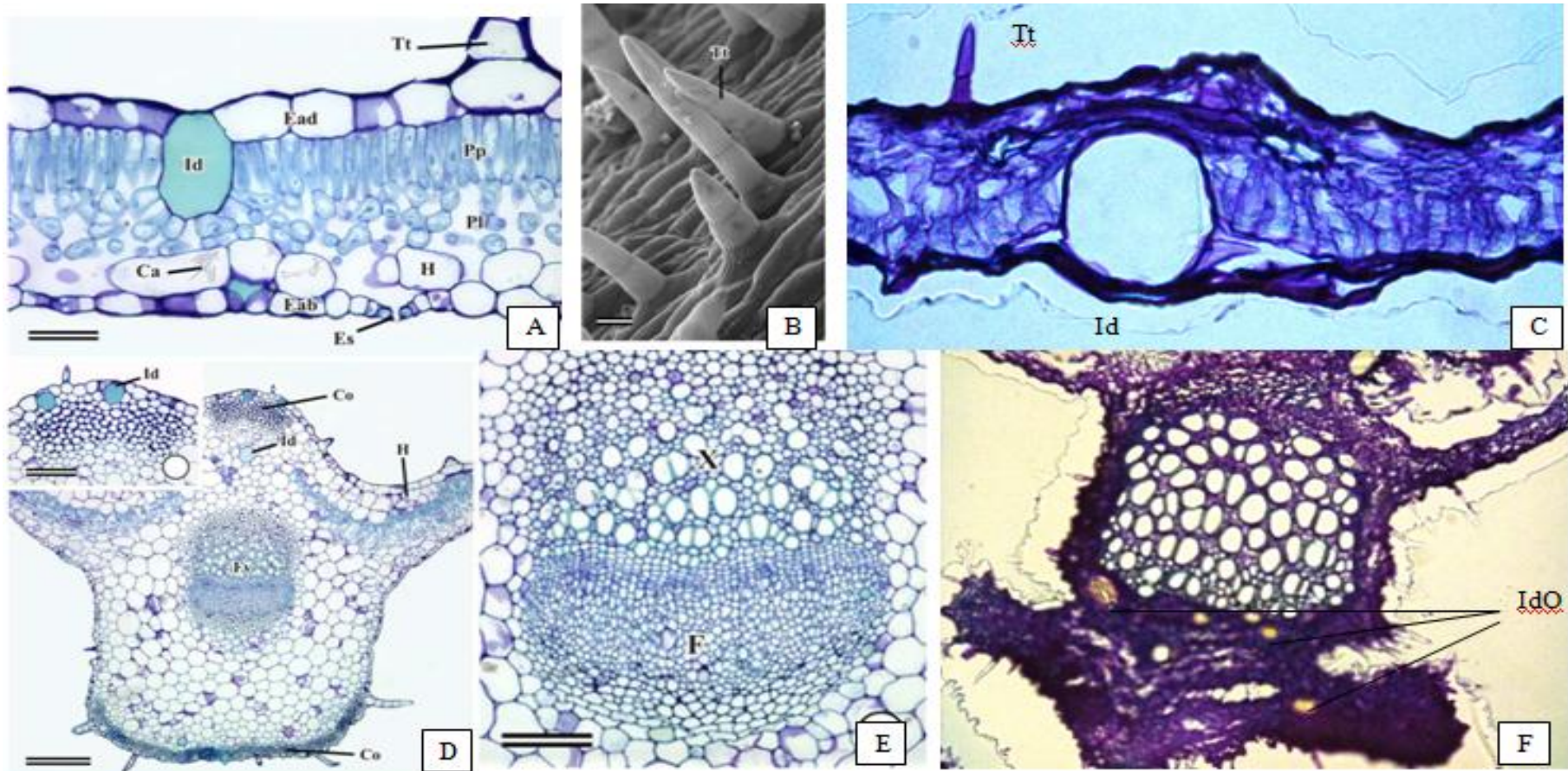
Em estudos da anatomia e histologia de folhas de *P. umbellata*, a planta é descrita por apresentar folhas hipoestomáticas, sendo possível visualizar em ambas as faces da folha idioblastos volumosos e ovalados e tricomas tectores curtos unisseriados, pluricelulares e com ápices agudos (**Figura 6A-C**). Na região do limbo, foram descritas células epidérmicas retangulares em seção transversal, cutícula adaxial espessa, parênquima paliádico composto por uma camada, parênquima lacunoso com uma a três camadas (**Figura 6A**). Na região da nervura central e conforme demonstrado na **Figura 6D-E**, foi descrito um feixe vascular na região mediana e a presença de idioblastos com conteúdo rico em lipídeos (GOGOSZ *et al.*, 2012 & MARINHO, 2008).

A análise anatômica da folha realizada na autenticação da droga vegetal abordou a região do limbo e da nervura central, apresentando também a estrutura, o volume e a forma do parênquima, porém prejudicados por se tratar de uma droga vegetal posteriormente reidratada. Ainda assim foi possível verificar as principais estruturas identificadoras da espécie. Na região do limbo podem-se observar células colunares formando o parênquima, em ambas as faces pode ser visualizado idioblastos volumosos

arredondados e a presença de tricomas tectores unisseriados pluricelulares de ápice agudo (**Figura 6C**).

Na análise da nervura central, apesar de não podermos identificar a nervura principal no material vegetal adquirido e termos trabalhado com uma nervura secundária proeminente, foi possível observar a manutenção do padrão vascular do xilema com um único feixe vascular e a presença de idioblastos oleíferos próximos a epiderme (**Figura 6F**).

**Figura 6** – Autenticação de droga vegetal por fotomicrografias de sessões transversais foliar de *P. umbellatum*. **A**<sup>1</sup> e **C**, Regiões do limbo; **B**<sup>1</sup>, eletromicrografia de varredura detalhando tricomas tectores; **D-E**<sup>1</sup> e **F**, região da nervura central. Eb: epiderme abaxial; Ed: epiderme adaxial; F: Floema; fv: feixe vascular; H: hipoderme; Id: idioblasto; O: oleífero; PL: parênquima lacunoso; PP: parênquima paliçádico. Cl: colênquima; Tt: tricoma tector; X: Xilema. FONTE: <sup>1</sup>MARINHO, 2008.

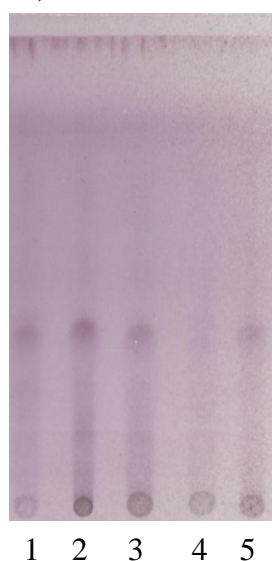


## 6.2 Obtenção dos extratos

Os extratos brutos de *P. umbellatum* foram obtidos através de maceração com diferentes solventes buscando um extrato mais rico em 4NC, ou uma alternativa mais viável para extração do mesmo, bem como verificar a diferença da atividade antifúngica em função do solvente extrator. A partir desses extratos foram realizados fracionamentos sequenciais e, durante esse processo, algumas outras moléculas e precipitados foram obtidas. Paralelamente, as frações e precipitados obtidos foram sendo testados para ensaios biológicos de atividade antifúngica.

As massas obtidas pelo processo de maceração com diferentes solventes foram: 1,58g hexano (3,16%); 4,31 AcOEt (8,62%); 4,04g clorofórmio (8,08%) e 4,73g (9,46%) etanólico. Um perfil cromatográfico dos extratos diluídos pode ser visto na **Figura 7**. Para o fracionamento em maior escala, foram obtidos, após secagem em rotaevaporador e posteriormente em capela, 7,34g de extrato hexânico (3,67%) e 36,21g do extrato etanólico (9,05%).

**Figura 7 – Análise CCD em sílica gel de extratos de partes aéreas de *P. umbellatum* obtidos com diferentes solventes.** Aplicação de 15  $\mu$ L na concentração de 10mg/mL. Anisaldeído sulfúrico como revelador. Ordem de aplicação: 1- extrato hexânico; 2- extrato etanólico; 3- extrato AcOEt; 4- extrato Hex/AcOEt 1:1 ; 5- Padrão 4NC isolado previamente.

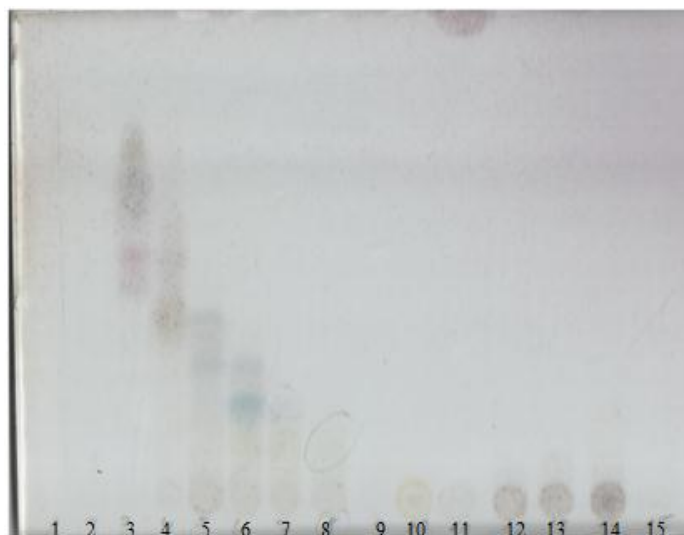


Notamos a presença de bandas majoritárias presentes de maneira semelhante em todos os extratos. O  $R_f$  e a coloração obtida pela eluição do 4NC nesta CCD serviram como marcadores para todo o estudo.

### 6.3 Fracionamento por Cromatografia em coluna

A CCD do fracionamento do extrato hexânico de *P. umbellatum* denominada CC1 pode ser visualizado na **Figura 8**. A baixa atividade biológica destas frações fez com que o estudo não continuasse nesta direção.

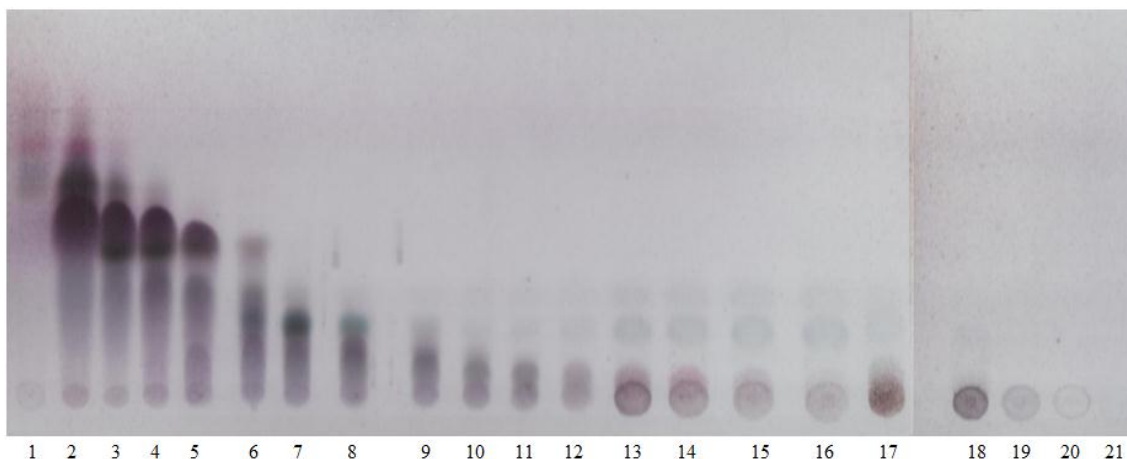
**Figura 8** – Análise CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC1 . Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 7:3. Revelador: Anisaldeído sulfúrico



O fracionamento do extrato hexânico inicialmente visava a obtenção do 4NC, pois seu isolamento já havia sido descrito através desse extrato (JANUÁRIO, 1994& KIJJOA, 1980).

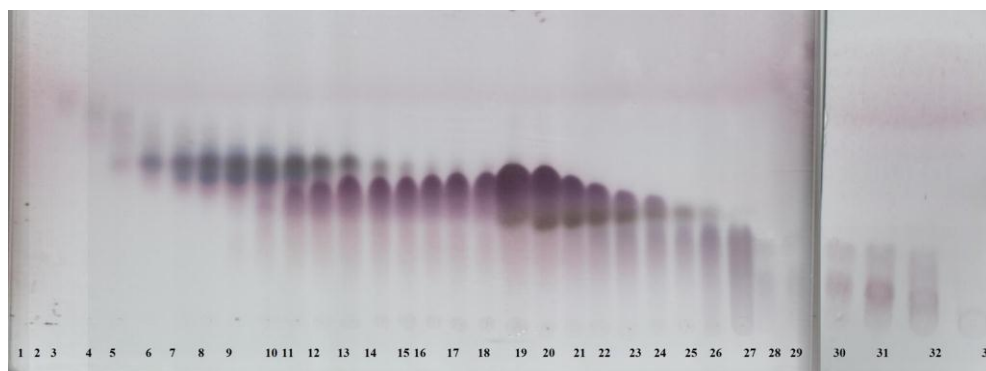
Na **Figura 9** pode-se visualizar a CCD do fracionamento da partição metanólica do extrato hexânico (HM), obtida com MeOH 80% do extrato hexânico de *P. umbellatum* denominada CC2 que gerou 21 frações.

**Figura 9– Análise CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC2.** Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 7:3. Revelador: anisaldeído sulfúrico.



A fração 3CC2 foi novamente fracionada e a análise CCD do fracionamento CC3 pode ser observada na **Figura 10**. As frações 14 a 19 foram reunidas e lavadas com MeOH, obtendo-se um precipitado denominado Substância 1, que posteriormente analisada em RMN e identificada como sendo a sesamina.

**Figura 10 – Análise CCD em sílica gel 60G das frações provenientes de CC3.** Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 7:3. Revelador: anisaldeído sulfúrico.

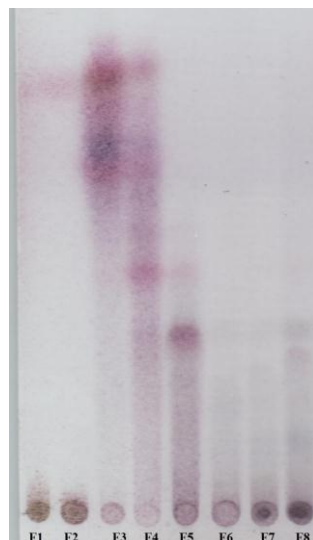


Apesar da hipótese inicial de que o isolamento do 4NC a partir do extrato hexânico seria mais fácil, o rendimento (massa) de extrato obtido por maceração inviabiliza o processo.

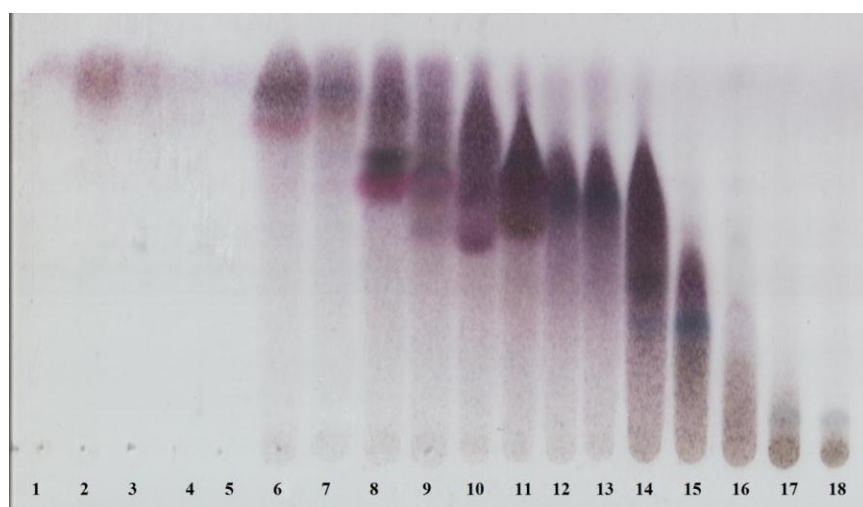
Na **Figura 11** pode ser observado a CCD proveniente do fracionamento da fração hexânica do extrato etanólico de *P. umbellatum* denominada CC4. A escolha da fração 5CC4 para o fracionamento se deu tanto pela atividade microbiológica quanto

pela presença do 4NC, resultando nas frações observadas na **Figura 12**.

**Figura 11 – Análise CCD em sílica gel 60G da CC4.** Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 8:2. Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

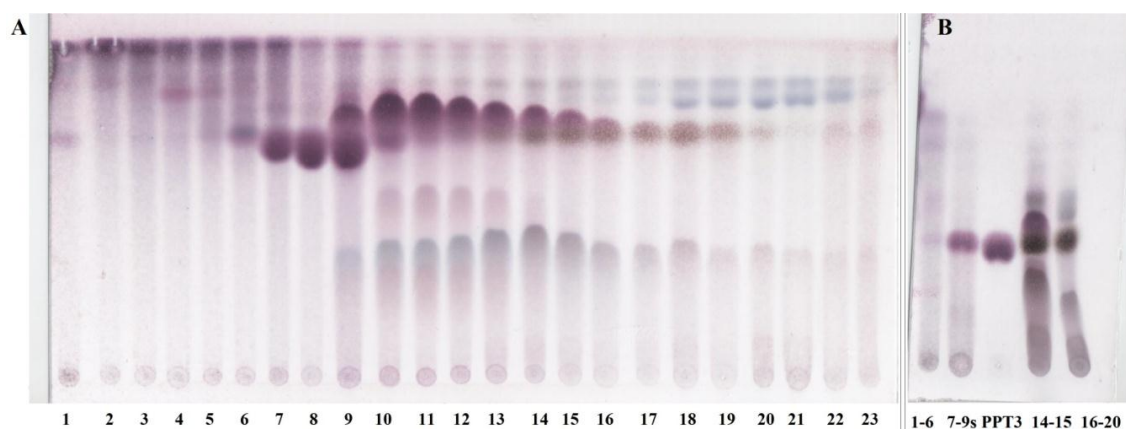


**Figura 12 – Análise CCD em sílica gel 60G das frações providas de CC5.** Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 7:3. Revelador: anisaldeído sulfúrico



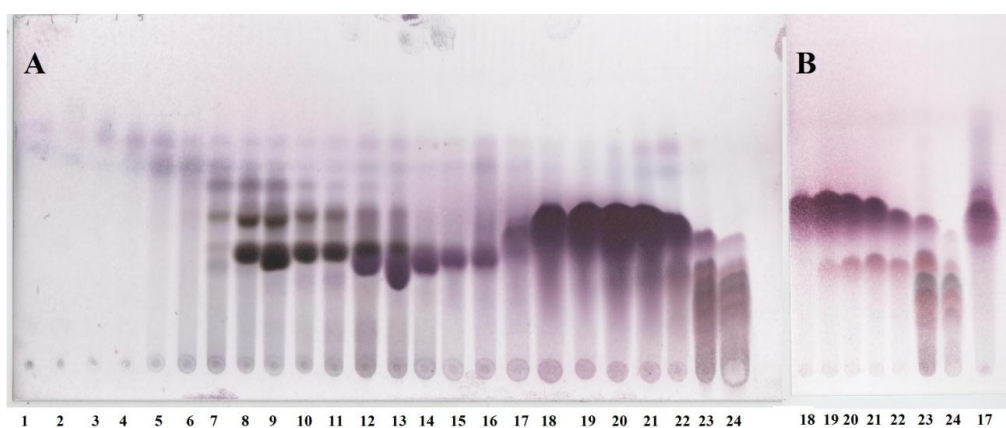
A fração 11CC5 foi escolhida para dar continuidade ao fracionamento devido à sua atividade antifúngica e sua massa total. O fracionamento denominado CC6 levou a um grupo de frações enriquecido em 4-NC e a uma fração em que ocorreu precipitação com metanol (**Figura 13**).

**Figura 13 – Análise CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC6.** Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 7:3. Revelador: anisaldeído sulfúrico. A: todas as frações coletadas. B: análise das frações após serem reunidas e do PPT2 obtido por lavagem com MeOH



As frações 10-13CC6 foram então reunidas (191mg) e eluídas sob as condições descritas pela CC7 e o resultado obtido está demonstrado na **Figura 14**. As frações foram reunidas em dois grupos devido ao perfil cromatográfico e aspecto visual de coloração: 17-18 (amarelo); 19-22 (verde).

**Figura 14 – CCD em sílica gel 60G do fracionamento CC7.** Condições de eluição da CCD: Hex/AcOEt 7:3. Revelador: anisaldeído sulfúrico. A: todas as frações coletadas. B: Frações de 17 a 24 diluídas pela metade da concentração apresentada em A.

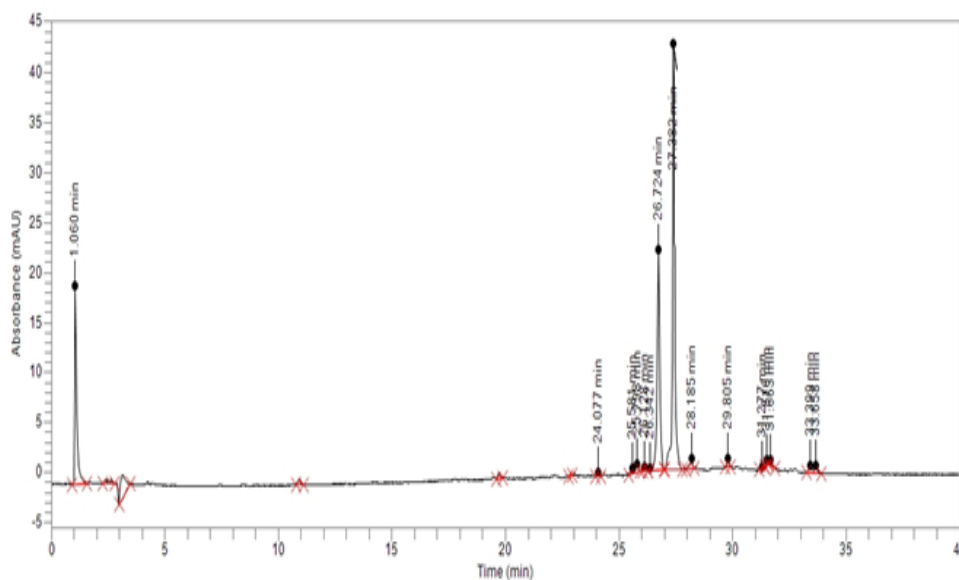


#### 6.4 Análises em CLAE-UV

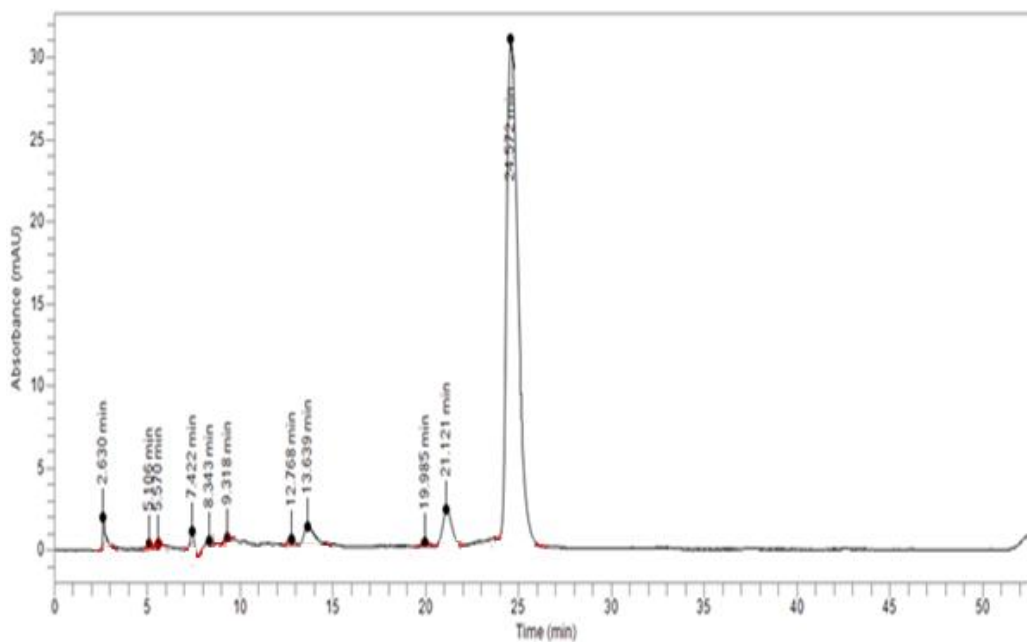
Visando o isolamento do 4NC, os dois grupos de frações reunidos que apresentaram perfil semelhante em CCD (17-18 e 19-22 CC7), foram analisados em

CLAE-UV para uma análise mais minuciosa quanto a presença de impurezas. O método de análise foi desenvolvido através de uma análise inicial em gradiente exploratório (Figura 15) e depois transferido e ajustado para modo isocrático (Figuras 16 e 17).

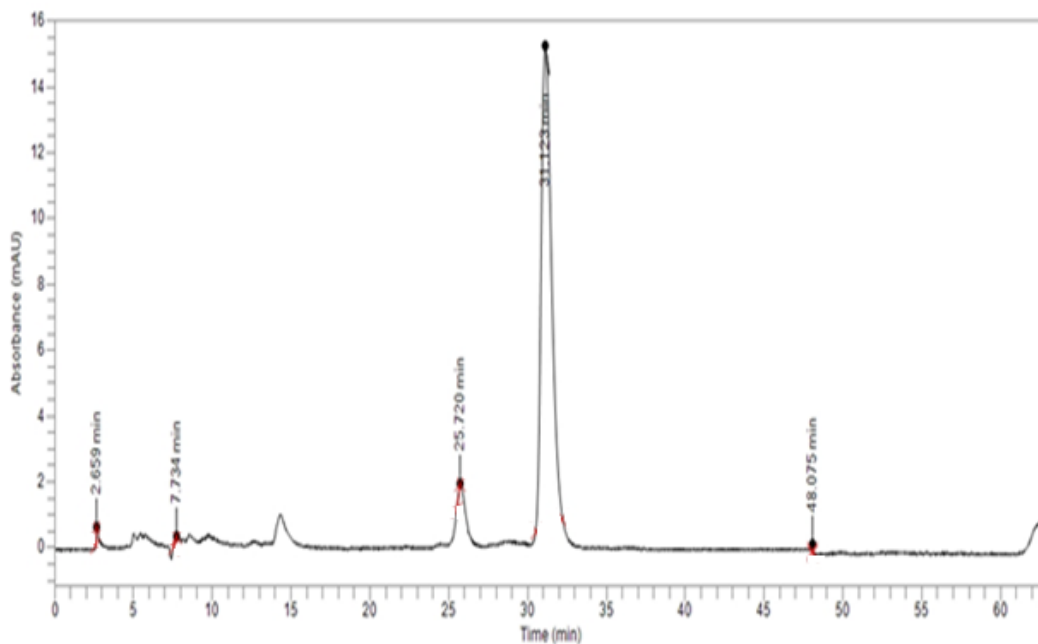
**Figura 15 – Cromatograma em CLAE-UV da fração 17-18 da CC7.** Condições de análise: Modo gradiente 25min 60-100% MeOH, 15 min MeOH 100%. Vazão 1 mL/min, leitura em 254nm.



**Figura 16 – Cromatograma em CLAE-UV da fração 17-18 da CC7.** Condições de análise: Modo isocrático 85% MeOH. Vazão 0,4 mL/min, leitura em 254nm.

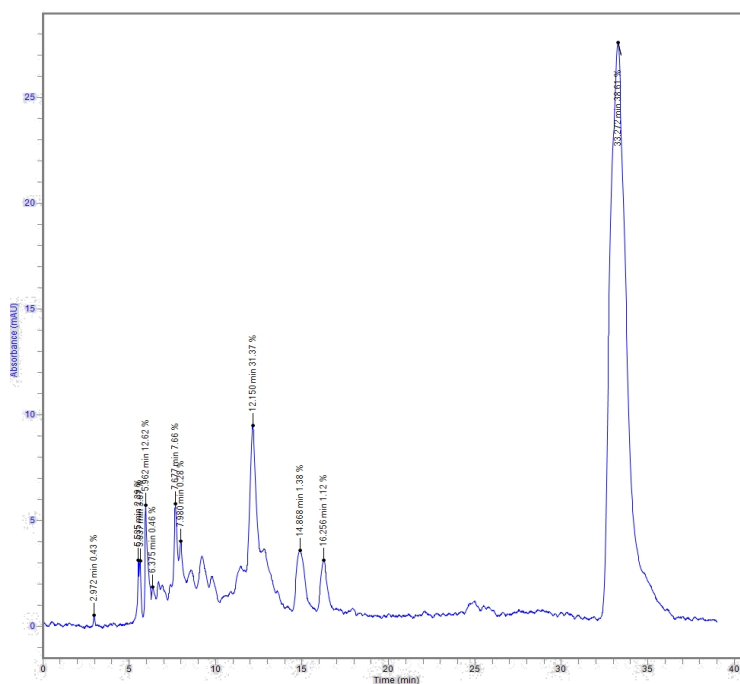


**Figura 17 – Cromatograma em CLAE-UV da fração 19-22 da CC7.** Condições de análise: Modo isocrático 83% MeOH, 17% H<sub>2</sub>O, vazão 0,4 mL/min, leitura em 254nm.



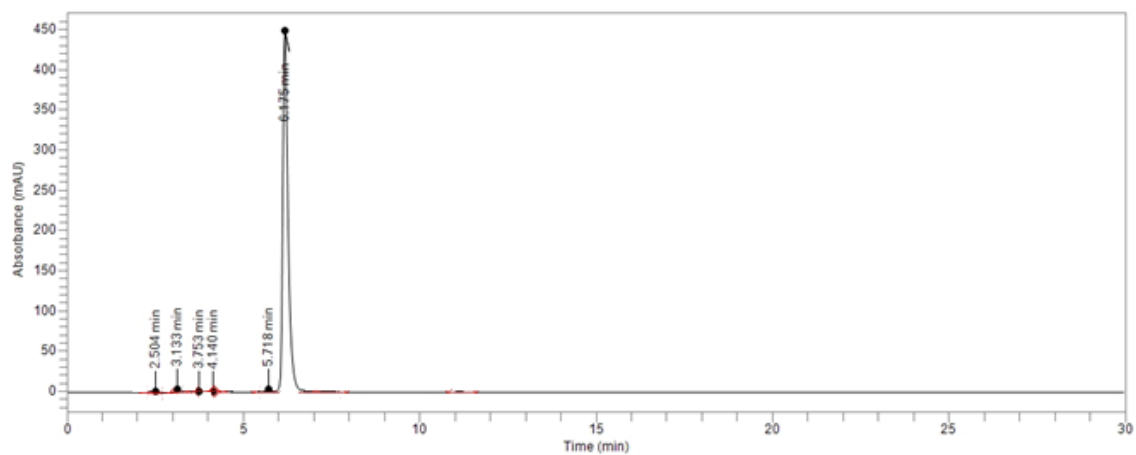
Para transposição para o modo preparativo, foi escolhido o método com 85% de MeOH, onde o pico majoritário foi coletado aos 35 minutos da corrida, conforme visto na **Figura 18**.

**Figura 18 – Cromatograma em CLAE-UV PREP para obtenção da Substância 2.** Condições de análise: Modo isocrático 85% MeOH, 15% H<sub>2</sub>O, vazão 8 mL/min, leitura em 254nm.



Após secagem em rotaevaporador com adição de AcOEt para eliminação da água, a amostra coletada foi solubilizada novamente, submetida ao mesmo tratamento e analisada novamente, conforme demonstrado na **Figura 19**.

**Figura 19** – Cromatograma em CLAE-UV da Substância 2. Condições de análise: Modo isocrático 90% MeOH, 10% H<sub>2</sub>O. Vazão 1mL/min, leitura em 282nm.



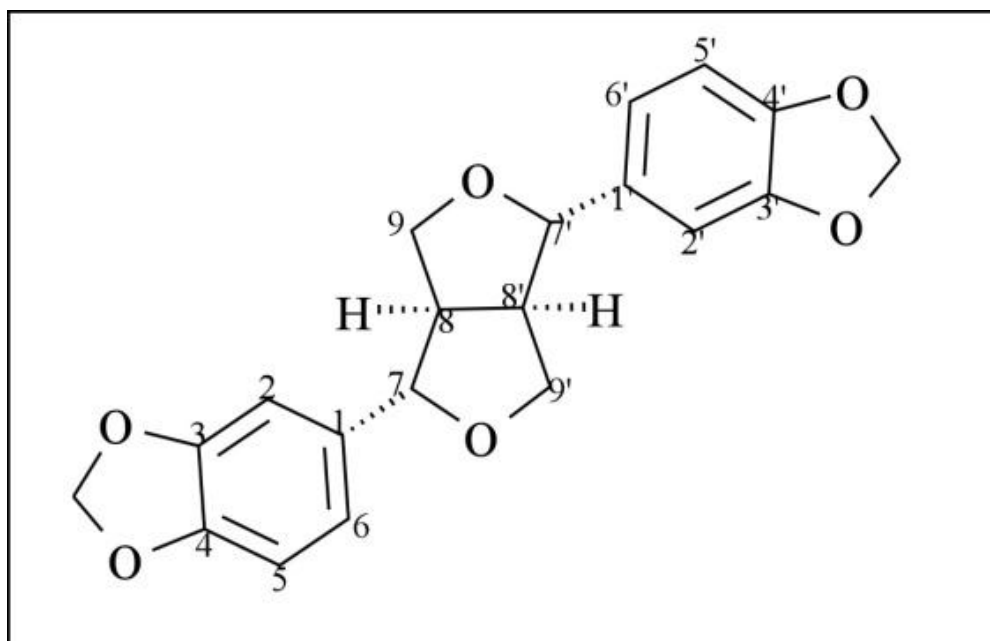
## 6.5 Identificação de substâncias

### 6.5.1 Substância 1 - Sesamina

A substância 1 foi identificada como sendo a lignana sesamina (**Figura 20**). Essa substância já foi isolada nessa mesma espécie e em outras da mesma família (BERGAMO, 2003). A identificação foi feita pelo espectro obtido de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Figura 19**) em comparação com a descrição na literatura, conforme demonstrado na Tabela 1.

O singlete em  $\delta$  5,99 observado no RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1 (Tabela 1, Figura 19) corresponde aos grupamentos 3,4-metilenodioxifenílicos ligados à unidade furânica em equatorial (eq.). Os sinais em  $\delta$  4,10 e 3,74 correspondem aos H 9 e H 9', nas posições axial (ax) ou equatorial (eq). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Tabela 1, Figura 22**) confirma a estrutura da lignana sesamina. Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  estão de acordo com os dados obtidos na literatura (BERGAMO, 2003, SILVA *et al.*, 2014).

**Figura 20 - Estrutura molecular da substância 1 – sesamina.**

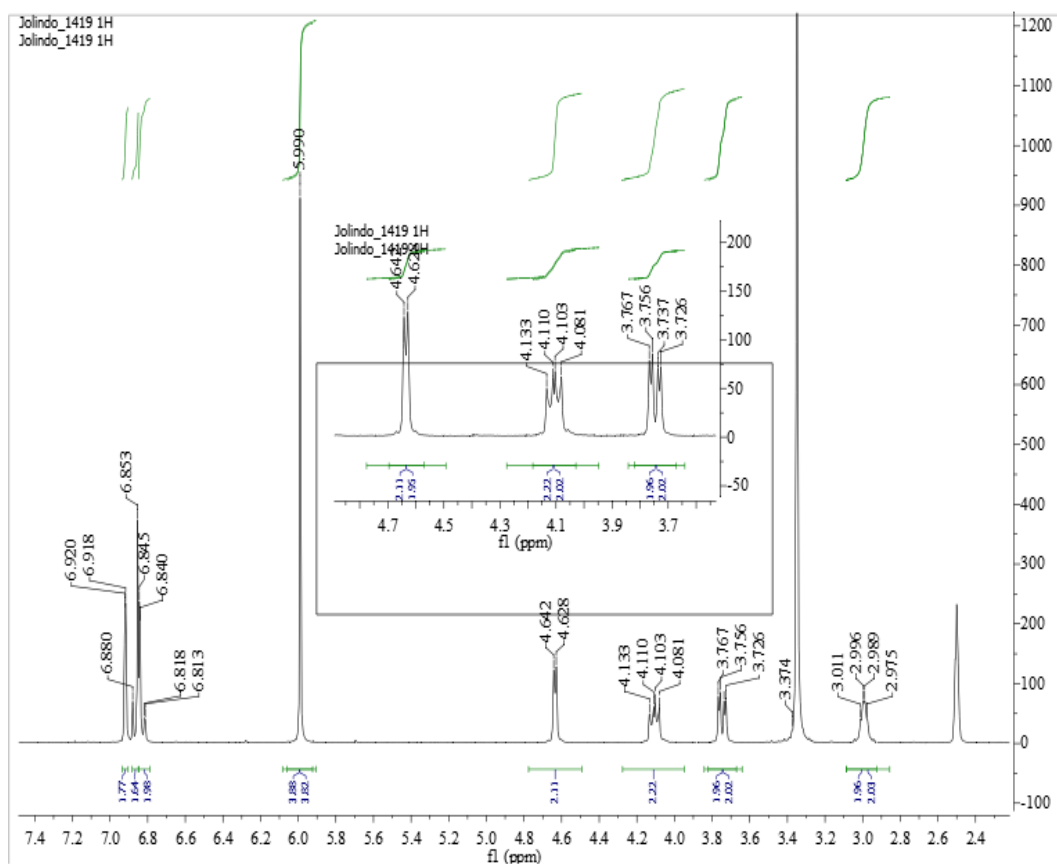


**Tabela 1 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância 1 ( $\delta$  ppm, DMSO- $d_6$ , 300 MHz  $^1\text{H}$  e 75Hz  $^{13}\text{C}$ ) obtidos experimentalmente em comparação com a literatura ( $\delta$  ppm, DMSO- $d_6$ , 300 MHz  $^1\text{H}$  e 75Hz  $^{13}\text{C}$ ).**

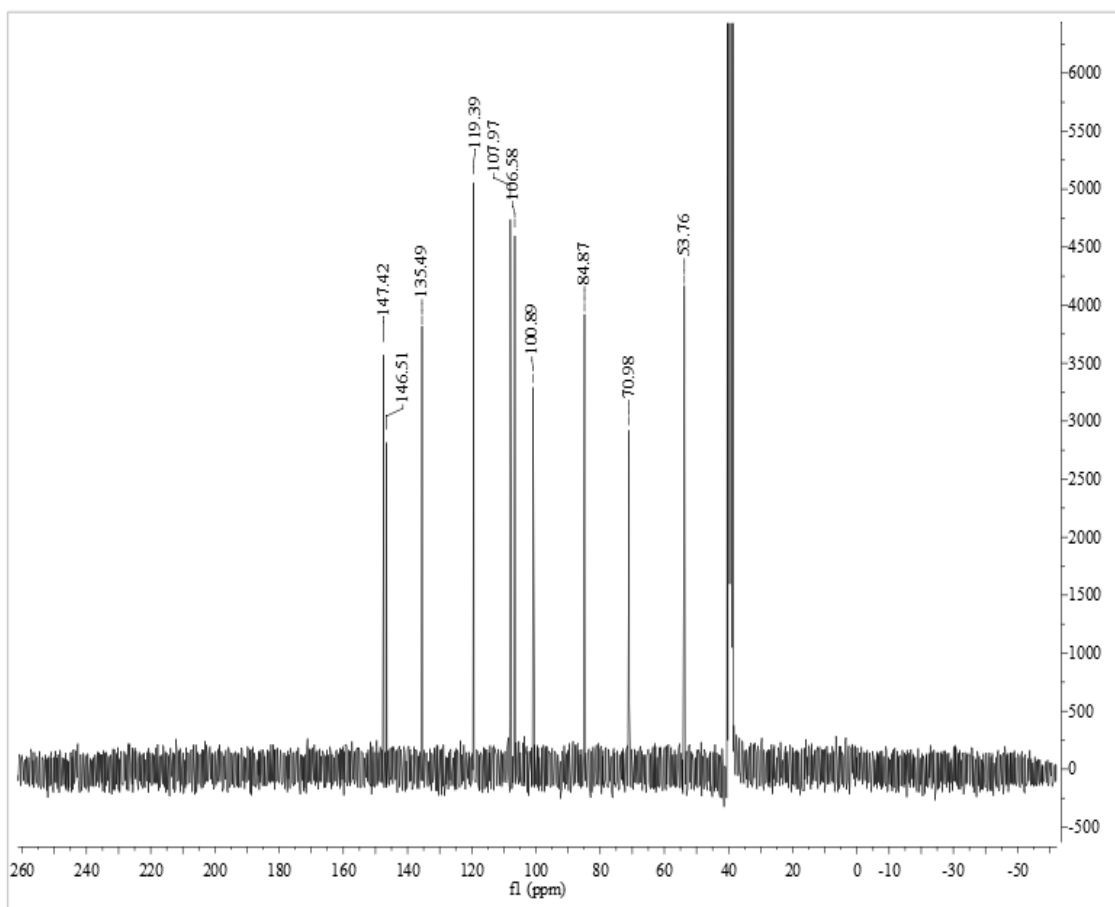
CARBONO	$^1\text{H}$ obtido	$^1\text{H}$ literatura*	$^{13}\text{C}$ obtido	$^{13}\text{C}$ literatura*
1,1'	-	-	135,5	135,2
2,2'	6,95 d ( $J= 0,6$ Hz)	6,85 d ( $J= 1,2$ Hz)	106,6	106,7
3,3'	-	-	146,5	147,9
4,4'	-	-	147,4	148,2
5,5'	6,85 d ( $J= 8,1$ Hz)	6,77 d ( $J= 8,4$ Hz)	108,0	108,4
6,6'	6,83 dd ( $J= 1,5$ e 8,1 Hz)	6,79 dd ( $J= 8,4$ e 1,2)	119,4	119,5
7,7'	4,62 d ( $J= 4,2$ Hz)	4,71 d ( $J= 4,2$ Hz)	84,9	86
8,8'	3,01	3,05 m	53,8	54,5
9,9' eq	4,10 dd ( $J= 6,9$ e 9,0 Hz)	4,23 dd ( $J= 9,2$ e 6,9 Hz)	71,0	71,9
9,9' ax	3,74 dd ( $J= 3,3$ e 9,0 Hz)	3,86 dd ( $J= 9,2$ e 3,6 Hz)		
-OCH <sub>2</sub> O-	5,99 s	5,96s	100,9	101,3

\*(SILVA *et al.*, 2014)

**Figura 21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 1 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).**



**Figura 22 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 1 (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).**



### 6.5.2 4-nerolidilcatecol

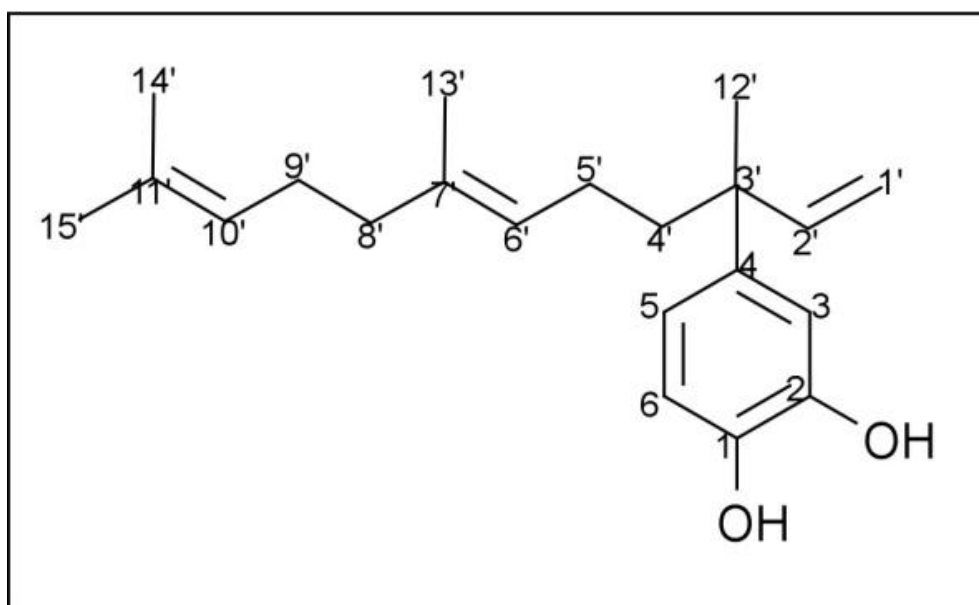
A substância 2 foi identificada como sendo o principal composto com atividade biológica presente na planta, o 4-nerolidilcatecol (**Figura 23**). A identificação foi realizada através da obtenção dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 24 e 25**) em comparação com a literatura, conforme demonstrado na Tabela 2.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Tabela 2, Figura 24**) do 4-nerolidilcatecol apresenta sinais característicos de hidrogênios aromáticos e alifáticos. Os sinais na região entre  $\delta$  5 e 6 (ppm) são normalmente atribuídos a olefinicos, com isso, os sinais em  $\delta$  5,06 e 5,98 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios ligados aos carbonos C-1' e C-2', enquanto os hidrogênios ligados aos carbonos C-6' e C-10' apresentaram deslocamento químico  $\delta$  5,07 e 5,98. Os sinais na região entre  $\delta$  1 e 2 (ppm) geralmente correspondem a metilas, conforme podemos ver em  $\delta$  1,32 (3H),  $\delta$  1,67 (3H), 1,51 (3H)

e  $\delta$  1,59 (3H), enquanto o deslocamento químico dos três últimos sinais confirmam a presença de destes próximos a dupla ligação, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C-12', C-13', C-14' e C-15', respectivamente. Os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos apresentaram deslocamento químico em  $\delta$  6,85 ,  $\delta$  6,73 e em  $\delta$  6,76, que foram atribuídos aos carbonos C-3, C-5 e C-6, respectivamente, confirmando o grupamento catecol.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 2, Figura 25) confirma a estrutura do 4-nerolidilcatecol. Os sinais obtidos em  $\delta$  141,4 e  $\delta$  143,2 são característicos do sistema catecol, correspondendo aos carbonos C-1 e C-2. Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  estão de acordo com os dados obtidos na literatura (BERGAMO, 2003& GUSTAFSON *et al.*, 1992& KIJJOA, 1980).

**Figura 23 - Estrutura molecular substância 2 – (4-nerolidilcatecol).**

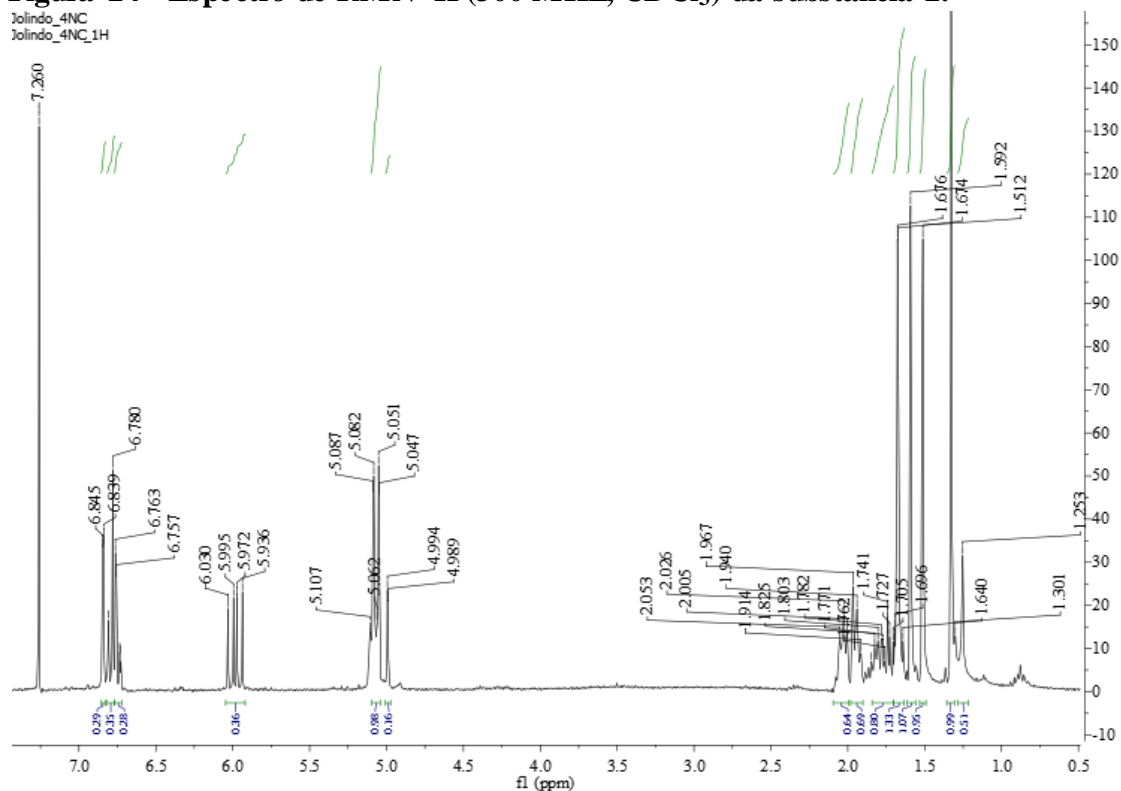


**Tabela 2 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância 2 ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz  $^1\text{H}$  e 75Hz  $^{13}\text{C}$ ) em comparação com a literatura ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz  $^1\text{H}$  e 75Hz  $^{13}\text{C}$ ).**

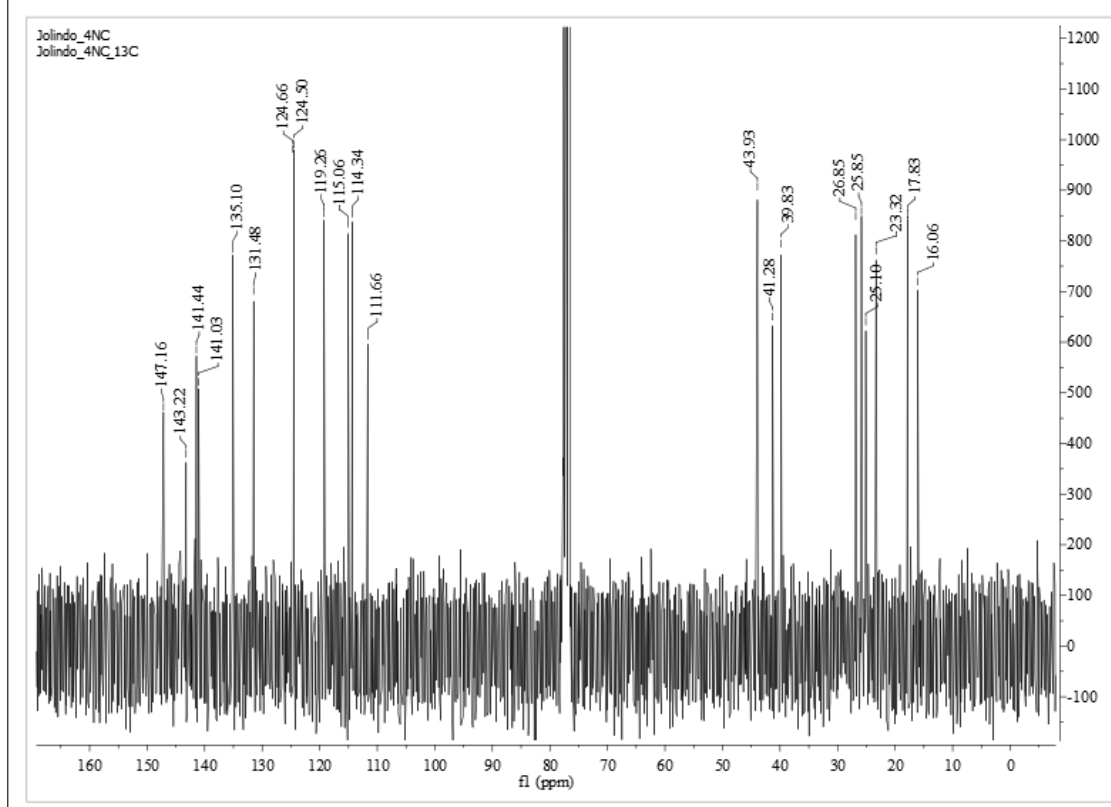
Carbono	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$ literatura*	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ literatura*
1	-	-	141,4	141,3
2	-	-	143,2	143,0
3	6,84 (d, $J= 1,8\text{Hz}$ )	6,83 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$ )	115,1	114,3
4	-	-	141,3	115,0
5	6,74 (dd, $J = 1,8$ e $8,4 \text{ Hz}$ )	6,74 (dd, $J = 8,3$ e $2,0 \text{ Hz}$ )	119,3	119,2
6	6,79 (d, $J= 8,4 \text{ Hz}$ )	6,78 (d, $J = 8,3 \text{ Hz}$ )	114,3	141,1
1'	5,07 (dd, $J = 10,8$ e $1,2 \text{ Hz}$ )	5,05 (dd, $J = 10,7$ e $1,2 \text{ Hz}$ )	111,7	111,6
2'	5,98 (dd, $J= 10,5$ e $17,4 \text{ Hz}$ )	5,97 (dd, $J = 17,6$ e $10,7 \text{ Hz}$ )	147,2	147,1
3'	-	-	43,9	43,8
4'	1,94 (m)	1,94 (m)	41,3	41,1
5'	1,77 (m)	1,71 (m)	23,3	23,1
6'	4,99 (d, $J= 1,5 \text{ Hz}$ )	5,01 (dd, $J=17,6, 1,2 \text{ Hz}$ )	124,5	124,4
7'	-	-	135,1	135,0
8'	2,03 (m)	2,03 (m)	39,8	39,6
9'	1,94 (m)	1,78 (m)	26,9	26,7
10'	5,08 (m)	5,08 (m)	124,7	124,6
11'	-	-	131,5	131,4
12'	1,32 (s)	1,31 (s)	25,1	24,9
13'	1,67 (d)	1,67 (s)	16,1	15,8
14'	1,51 (s)	1,51 (s)	25,8	25,6
15'	1,59 (s)	1,59 (s)	17,8	17,6

\*(GUSTAFSON *et al.*, 1992)

**Figura 24 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 2.**



**Figura 25 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 2.**



### 6.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A classificação quanto a capacidade de inibição em relação a concentração é controversa: ALIGIANNIS *et al.*, 2001 considera uma faixa mais ampla para valores de CIM para extratos classificados como fracos se estão acima de 1,6mg/mL; inibidores fortes até 0,5mg/mL e moderados na faixa entre essas duas concentrações. COS *et al.*, 2006 considera que os valores adequados em ensaios biológicos para caracterizar atividade seletiva e relevante como sendo de 100 µg/mL para extratos e 25 µM para compostos puros. Para nossos estudos, foi utilizado a faixa descrita por HOLETZ *et al.*, 2002, classificando como boa atividade extratos com CIM menor que 100 µg/ml, atividade moderada entre 100 e 500 µg/mL e inativo acima de 1000 µg/mL.

A triagem inicial da atividade antifúngica foi realizada com extratos de *P. umbellatum* obtidos por maceração utilizando-se diferentes solventes: hexano, acetato de etila, clorofórmio e etanol e um extrato aquoso obtido por infusão. Foram utilizados como controle anfotericina B, fluconazol e griseofulvina. A atividade antifúngica demonstrada frente a *M. canis* e *T. rubrum* estão apresentados na **Tabela 3**.

Os extratos que apresentaram maior atividade antifúngica foram o etanólico e o clorofórmico, frente a *M. canis* (39,1 e 78,1 µg/mL, respectivamente), com diferença de uma a duas diluições na placa de microdiluição quando avaliados frente a *T. rubrum* (156,3 µg/mL para ambos). O extrato provindo de extração com acetato de etila demonstrou atividade mediana para *M. canis* e baixa frente a *T. rubrum*. A atividade dos extratos aquoso e hexânico demonstraram valores de CIM mais baixos que os demais tanto para *M. canis* quanto para *T. rubrum*.

**Tabela 3** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes extratos de *P. umbellatum* e antifúngicos.

Amostras	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>Microsporium canis</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Extrato Hexânico	1250	1250
Extrato Acetato de Etila	78,1	625
Extrato Etanólico	39,1	156,3
Extrato Clorofórmio	78,1	156,3
Extrato Aquoso (Infusão)	1250	>1250
Anfotericina B	0,25	0,25
Fluconazol	16	16
Griseofulvina	2	0,5
Terbinafina	2	0,5

A capacidade antimicrobiana do extrato hidroetanólico (EtOH 75 % v/v) de *P. umbellatum* foi demonstrada frente a diferentes bactérias, com valores de CIM de 25  $\mu\text{g/mL}$  para *Klebsiella pneumoniae*, e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  frente a *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, e *Enterococcus faecalis*, menor atividade contra *Staphylococcus aureus* (400  $\mu\text{g/mL}$ ) e 200  $\mu\text{g/mL}$  para *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes* (DA SILVA *et al.*, 2014).

Os valores de CIM observados para as frações obtidas do fracionamento do extrato hexânico apresentadas em CC1 podem ser observadas na **Tabela 4**. As frações obtidas do extrato hexânico demonstraram atividade dentro da faixa de 1250 a 312,5  $\mu\text{g/mL}$ . A fração que demonstrou melhor atividade foi a 4 (78,1  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a *M.canis* e F7 (39,1  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a *T. rubrum*. A sesamina apresentou alto valor de CIM (1250  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 4** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de frações de CC1 e precipitados obtidos do extrato hexano de *P. umbellatum*.

Fração ou amostra	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>
1	625	78,1
2	625	625
3	1250	625
4	78,1	312,5
5	156,3	312,5
6	156,3	312,5
7	156,3	39,1
8	312,5	156,3
9	156,3	312,5
10	625	312,5
11	>625	312,5
12	312,5	312,5
13	>625	312,5
14	1250	312,5
15	>625	312,5
Sesamina	1250	1250

Os resultados de CIM obtidos das frações da CC1 foram considerados insatisfatórios, pois a maioria ficou na faixa entre 1250 a 312,5  $\mu\text{g/mL}$ . A fração que demonstrou melhor atividade foi a 4 (78,1  $\mu\text{g/mL}$ ), que também é a fração mais enriquecida em 4NC entre estas.

As frações obtidas em CC4 (**Tabela 5**) demonstraram uma faixa maior de valores, variando desde ausência de atividade (2-3CC4) nas concentrações testadas, até valores de CIM mais significativos, como 78,1  $\mu\text{g/mL}$  para 6CC4 para ambos micro-organismos.

**Tabela 5** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de frações obtidas de CC4 da partição hexânica do extrato etanólico de *P. umbellatum*

Fração	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>Microsporum canis</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
F1	1250	625
F2	>1250	1250
F3	>1250	1250
F4	312,5	156,3
F5	156,3	312,5
F6	78,1	78,1
F7	156,3	78,1
F8	312,5	312,5

**Tabela 6** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de frações obtidas pelo fracionamento CC5 de *P. umbellatum* e 4NC.

Fração	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>Microsporum canis</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
1	1250	625
2	1250	1250
3	625	625
4	625	625
5	625	625
6	625	625
7	625	312,5
8	312,5	625
9	156,3	156,3
10	39,1	78,1
11	9,8	39,1
12	19,5	19,5
13	78,1	156,3
14	156,3	78,1
15	78,1	78,1
16	78,1	39,1
17	156,3	156,3
18	312,5	312,5
4NC	2,4	4,9

Dentre as frações coletadas em CC5, os menores valores de CIMs foram obtidos para as frações 10, 11 e 12 CC5 frente a *M. canis* (**Tabela 6**). As frações de 1 a 8

apresentaram atividade na faixa de 1250 a 312,5 µg/mL para ambos os fungos, e as frações de 13 a 17, apresentaram CIM na faixa de 156,3e 39,1 µg/mL, enquanto a fração 18 apresentou uma menor inibição com 312,5 µg/mL para ambos os fungos.

A atividade antifúngica obtida de frações já havia sido avaliada previamente em nosso laboratório frente ao *T. rubrum* demonstrando CIMs de 78,1µg/mL para as frações hexano e diclorometano e 156,3 µg/mL para a fração AcOEt, além dos extratos clorofórmio e hidroalcoólico (EtOH 70%) com CIM igual a 156,3 µg/mL (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana do 4NC, das frações metanólica residual, diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico de *P. umbellatum* foram demonstradas frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de CIM menores que 10 µg/mL para as frações metanólica e acetato de etila, enquanto os valores de CIM para o 4NC ficaram entre 11 e 56 µg/mL e o extrato bruto demonstrou CIM de 15 µg/mL para *C.glabrata*, 9 µg/mL para *C. albicans* e 67 µg/mL para *C. neoformans* (BAGATELA *et al.*, 2013).

Em outro estudo, DA SILVA *et al.*, 2014, avaliou a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico (etanol 75%) frente a diferentes cepas de bactérias e relatou que a atividade deve estar ligada ao aumento da permeabilidade da parede celular e membrana celular da bactéria.

TABOPDA *et al.*, 2008 testaram a atividade antifúngica do extrato metanólico de *P. umbellatum* e de algumas frações e substâncias isoladas frente a seis microorganismos, incluindo *M.canis* por meio do ensaio de crescimento em ágar, no qual o Agar Sabouraud dextrose foi preparado com adição de cada amostra, na concentração final de 200 µg/mL. Foram inoculados cortes de 4 mm de diâmetro de inóculo removido de fungo cultivado em placa por 7 dias e foram calculadas as

porcentagens de inibição do crescimento radial. Neste estudo, as frações hexano e butanol apresentaram as menores taxas de inibição, enquanto o 4NC causou uma inibição próxima a 50% para a maioria dos microorganismos testados, e dois alcalóides nomeados como pieperumbelactanas demonstraram uma porcentagem de inibição maior que a demonstrada por padrões comerciais (miconazol e anfotericina B) contra *A. flavus* e *T. longifusus*, além de valores acima de 60% de inibição para a maioria dos demais microorganismos.

### **6.7 Determinação de CIM na presença de sorbitol e ergosterol exógeno**

As frações e extratos que demonstraram melhor atividade antifúngica tiveram novamente os valores de CIM avaliados, mas agora na presença e ausência de sorbitol (0,8 mol/L) ou ergosterol (400 µg/mL), com o objetivo de entender os mecanismos de ação que poderiam sugerir a ligação a componentes da parede celular ou da membrana, respectivamente.

Estes testes visaram avaliar o mecanismo de ação da amostra, pois se o valor de CIM sofresse aumento na presença de ergosterol exógeno, a amostra demonstraria capacidade de interagir com este, não atuando no ergosterol presente na membrana fúngica (ESCALANTE *et al.*, 2008, MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008). O sorbitol atua como estabilizante osmótico, e drogas que causam dano na parede celular desencadeiam lise celular, pois atuam gerando uma desestabilização organizacional, por exemplo, se ligando ou impedindo a biossíntese de lipídeos ou açúcares da parede celular. Isso prejudica o equilíbrio osmótico da célula com o meio e, portanto, na presença de um estabilizador osmótico como o sorbitol, a célula seria capaz de crescer (ESCALANTE *et al.*, 2008).

O aumento do CIM para a Anfotericina quando em presença de ergosterol ou de ergosterol era esperado, pois os polienos interagem se ligando ao ergosterol e

umentando a permeabilidade da membrana plasmática (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006), com a presença do ergosterol exógeno, a Anfotericina se ligaria a esse e, com isso, se liga menos ao ergosterol presente nas células fúngicas.

O micro-organismo escolhido para o estudo foi o *M. canis*. Os resultados, demonstrados na **Tabela 7**, no geral foram similares aos CIMs sem interferentes e houve variação da CIM de duas vezes para a fração 13CC5 enquanto que para a anfotericina B este aumento de CIM foi de quatro vezes na presença de ergosterol. Para o efeito do sorbitol, só houve aumento da CIM em duas vezes para a fração 12CC5 e para o extrato clorofórmico. Na determinação visual de CIM, uma alteração de 2 a 4 vezes o valor de CIM (equivalente a até dois poços) pode ser considerada dentro de uma margem de erro par ao teste e, portanto, estatisticamente iguais (GHELARDI *et al.*, 2014).

**Tabela 7** - Concentração inibitória mínima (CIM) na presença e ausência de ergosterol e sorbitol para frações de CC5 e extratos de *P. umbellatum* e antifúngicos contra isolado clínico de *M. canis*.

Amostras	CIM (µg/mL)		
	Sem adição de interferentes	Ergosterol	Sorbitol
Fração 9 CC5	156,25	156,25	78,125
Fração 10 CC5	39,06	39,06	39,06
Fração 11 CC5	9,77	9,77	9,77
Fração 12 CC5	19,53	19,53	39,06
Fração 13 CC5	78,13	156,25	78,13
Fração 15 CC5	78,13	39,06	39,06
Fração 16 CC5	78,13	39,06	19,53
Extrato Etanólico	39,06	78,13	39,06
Extrato Clorofórmico	78,13	156,25	156,25
Fluconazol	16	16	16
Anfotericina B	0,25	1	0,25

## 6.8 Citotoxicidade

As frações que demonstraram melhor atividade biológica frente a *M. canis* e *T. rubrum*, assim como o 4NC, foram também avaliadas quanto à atividade citotóxica, como forma de avaliar a segurança dessas como possíveis agentes terapêuticos. Os valores estão demonstrados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Avaliação do IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) do 4NC, dos extratos etanólico e clorofórmio e das frações de CC5 frente às linhagens celulares HepG2 e MRC-5

Amostra	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Hep G2	MRC-5
<b>10 CC</b>	251,5 $\pm$ 1,6	>500
<b>11 CC5</b>	75,6 $\pm$ 2,9	87,0 $\pm$ 7,0
<b>12 CC5</b>	76,0 $\pm$ 15,4	90,8 $\pm$ 21,4
<b>15 CC5</b>	282,8 $\pm$ 12,8	>500
<b>16 CC5</b>	281,3 $\pm$ 5,7	>500
<b>Ext. etOH</b>	>500	>500
<b>Ext. Clorof</b>	148,3 $\pm$ 10,8	139,5 $\pm$ 13,7
<b>4NC</b>	18,3 $\pm$ 3,3	31,5 $\pm$ 4,6

Nas concentrações testadas, as frações 10, 15 e 16 demonstraram baixa toxicidade (>250  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a Hep G2 (carcinoma de fígado humano) e nenhuma toxicidade para a linhagem MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). Enquanto o extrato etanólico bruto não demonstrou toxicidade frente a nenhuma das duas linhagens testadas.

SACOMAN *et al.*, 2008 determinaram a atividade antitumoral através da determinação da concentração que causa total inibição do crescimento celular do extrato de *P. umbellatum* obtido por maceração com diclorometano para diferentes linhagens celulares, variando entre 4 e 6,5  $\mu\text{g/mL}$  para as linhagens UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão, células não pequenas), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), 786-O (renal); em torno de 9  $\mu\text{g/mL}$  para as linhagens NCI-ADR/RES (ovário resistente a drogas), HT-29 (cólon), MCF-7 (mama) e uma inibição maior para células de leucemia

K-562, alcançando o valor de concentração de 1,55 µg/mL para inibição total do crescimento celular.

Frente a células de leucemia HL-60, o valor de IC<sub>50</sub> do extrato etanólico bruto de *P. umbellatum* foi de IC<sub>50</sub> igual a 5.3 µg/ml e de 0.4 µg/ml para o 4NC (LOPES *et al.*, 2012 LOPES *et al.*, 2013).

Os menores valores de IC<sub>50</sub> obtidos em nosso trabalho foram frente ao 4NC, com 18,3 µg/mL frente a Hep G2 e 31,5 µg/mL frente a MRC-5. Em outro estudo, o 4NC demonstrou citotoxicidade frente a três diferentes melanomas apresentando IC<sub>50</sub> na faixa de 30-40 µM após um dia em contato com a célula, diminuindo esse valor para 20-25 µM se mantido em contato com algumas linhagens por 48 h (BROHEM *et al.*, 2009). Frente a outras linhagens tumorais, o 4NC apresentou aproximadamente IC<sub>50</sub> de 12 µg/mL para B-16 (pele), MCF-7 (mama) e HCT-8 (cólon) e, assim como um derivado semissintético diacetilado, valores menores de IC<sub>50</sub> de 6 µg/mL para linhagens de leucemia HL-60 (PINTO *et al.*, 2006).

Em estudo com seis derivados do 4NC, além dos grupamentos catecol e nerolidol, a atividade antimalárica e a citotoxicidade foram avaliadas e os resultados demonstraram que a citotoxicidade do 4NC é inerente ao grupo catecol, que apresentou IC<sub>50</sub> igual a 1 µg/ml frente a linhagens tumorais HCT-8 (cólon), SF-295 (sistema nervoso central) e MDA/MB-435 (melanoma), enquanto o radical nerolidil apresentou valores mais altos, próximos a 13 µg/ml para as duas primeiras e acima de 25 µg/ml para a célula de melanoma (DA SILVA PINTO *et al.*, 2009).

A atividade antitumoral pode estar ligada à inibição da topoisomerase I em células KB demonstrada por eletroforese pelo 4NC extraído de *P.peltata* (MONGELLI *et al.*, 1999). Outros possíveis mecanismos de ação do 4NC propostos para explicar essa citotoxicidade foi a capacidade de induzir apoptose em melanoma e fibroblastos

normais, além do efeito inibitório na capacidade invasiva de tumores pela inibição de MMP2 (BROHEM *et al.*, 2009).

Entre outras causas para a toxicidade descrita, muitos esteróis, incluindo  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol já descritos nessa mesma planta, demonstraram atividade citotóxica através de sinalizações via receptores esteroidais e alterações na membrana que induzem o processo de apoptose (AWAD&FINK, 2000).

Comparando-se os valores de CIM e IC<sub>50</sub> obtidos neste trabalho, podemos observar que o CIM do extrato clorofórmico (156  $\mu$ g/ml) é maior que os valores de IC<sub>50</sub> obtidos frente as duas linhagens celulares testadas. O CIM obtido para as frações e 4NC demonstrou ser aproximadamente 4 vezes menor que os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os mesmos.

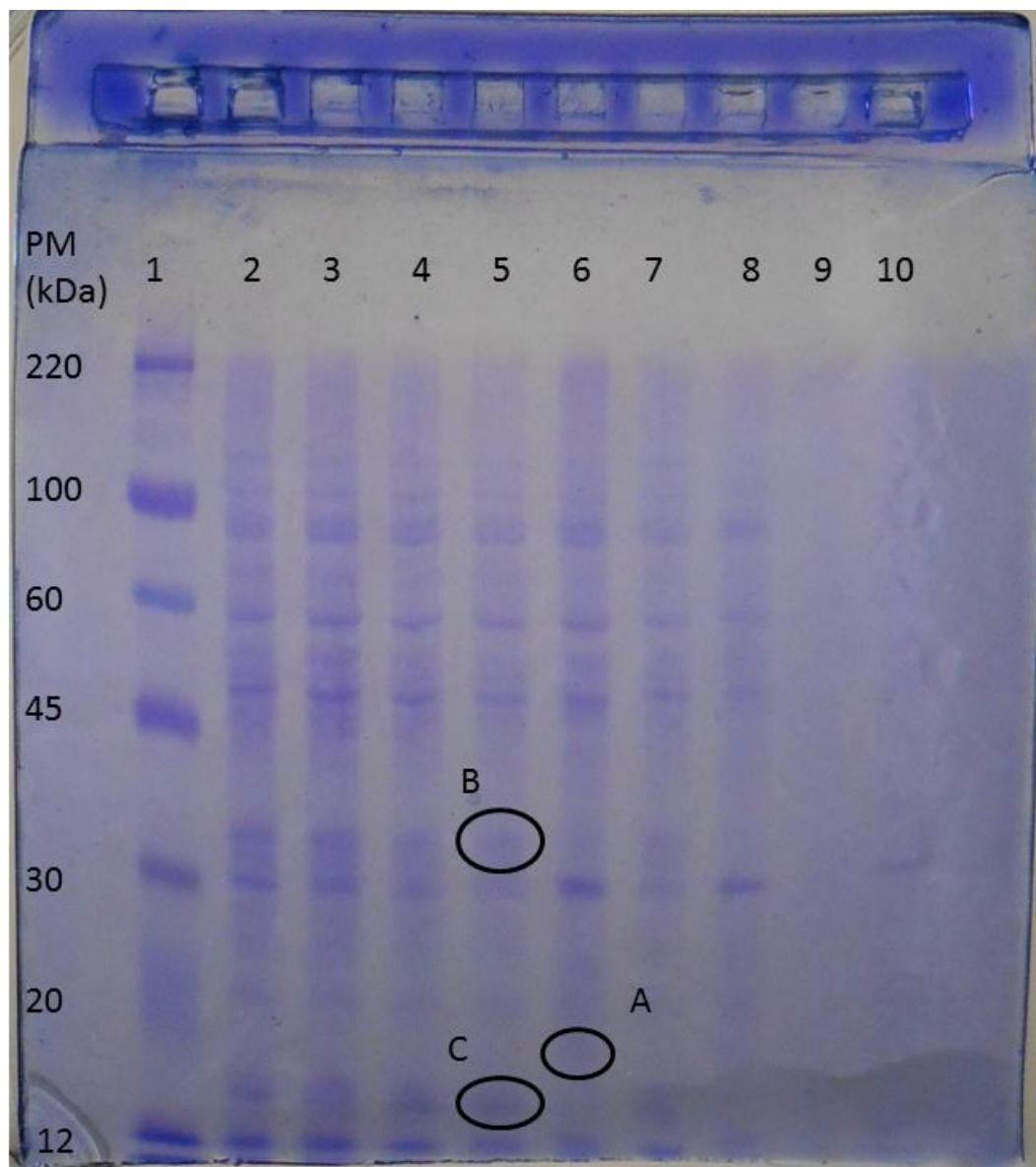
## **6.9 Avaliação da alteração no perfil proteico gerada por tratamento com 4NC**

### **6.9.1 Análise do perfil proteico através de eletroforese em gel de poliacrilamida**

As análises proteômicas tornaram-se muito importantes no campo funcional do genoma, principalmente devido ao conhecimento adquirido dos vários genomas sequenciados. A bioinformática e a bioestatística são essenciais para tais avaliações, para o delineamento dos dados gerados (SMITH *et al.*, 2009). Em se tratando de fungos dermatófitos, os estudos são mais restringidos a mecanismos de virulência e pouco tem sido estudado em relação à proteomas como abordagem na busca de novos alvos terapêuticos.

As **Figuras 26 e 27** mostram o resultado obtido da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas extracelulares obtidas dos inóculos de *M. canis* após tratamento com DMSO ou 4NC. Na **Figura 26**, quando se compara as colunas 5 (em que o inóculo foi tratado com 4NC) e 6 (em que o inóculo foi tratado

**Figura 26** – Gel SDS-PAGE 12% de proteínas extracelulares em diferentes concentrações de *M. canis* após tratamento com DMSO ou 4NC. Ordem de aplicação: 1- peso molecular padrão. 2- 4NC 240 ug/mL. 3- 4NC 200 ug/mL. 4- 4NC 160 ug/mL. 5- 4NC 115 ug/mL. 6- DMSO 115 ug/mL. 7- 4NC 80 ug/mL. 8- DMSO 80 ug/m. 9- 4NC 40 ug/mL. 10- DMSO 40 ug/mL



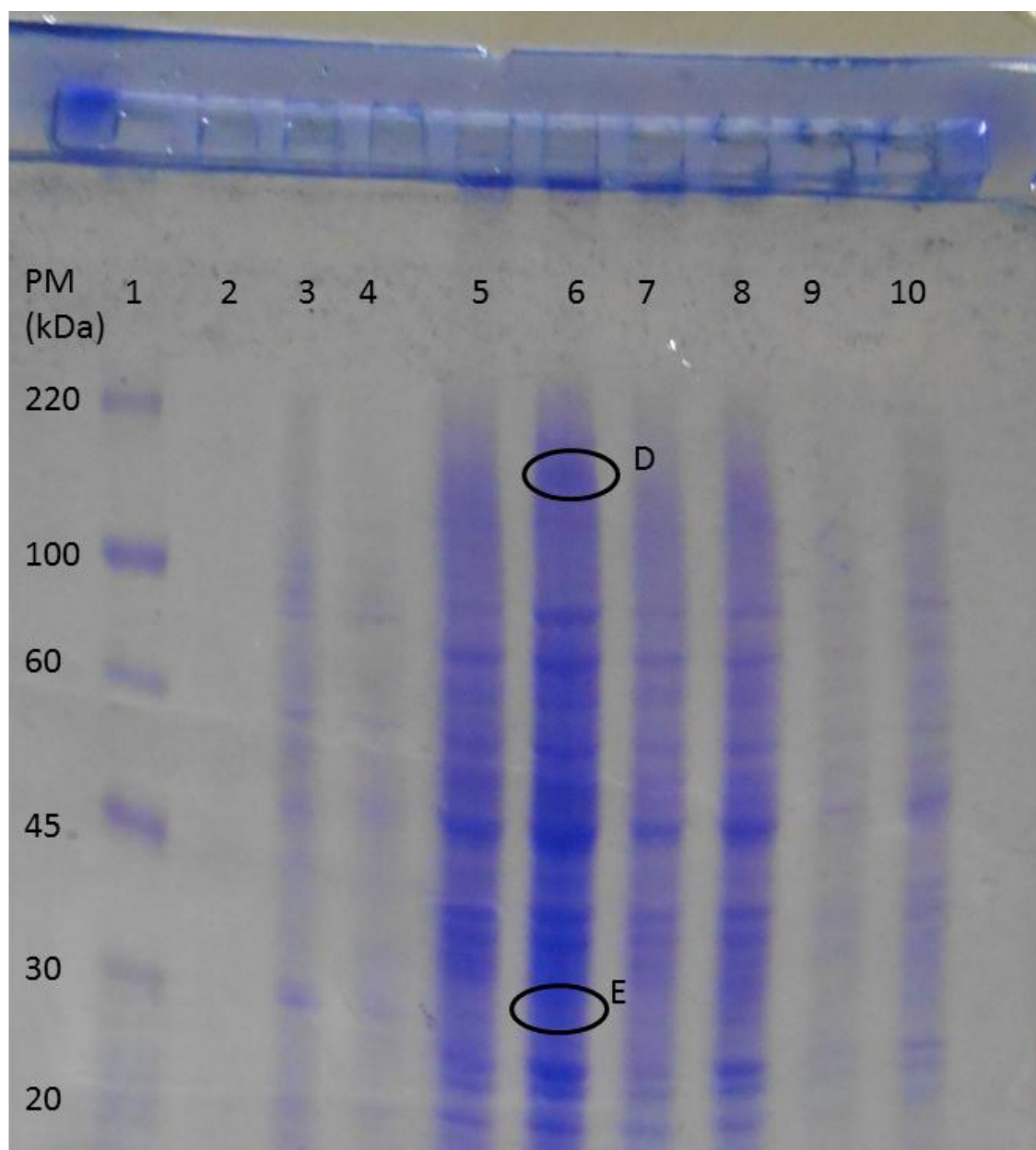
apenas com DMSO), observa-se que houve o desaparecimento de uma banda entre os padrões de peso molecular de 12 e 20kDa, marcada na **Figura 26** pela letra “A”.

Para o inóculo tratado com 4NC, observa-se que houve o aparecimento de algumas bandas, uma acima de 30 kDa (marcada pela letra “B”) e outra acima de 12 kDa (marcada na figura pela letra “C”). Em estudo prévio realizado em nosso laboratório e ainda não publicados, Rodrigues (2012) analisou o perfil proteico



A **Figura 28** traz a análise comparativa em eletroforese em SDS-PAGE das proteínas extraídas da massa celular de *M. canis* em diferentes concentrações após tratamento realizado apenas com DMSO ou com 4NC.

**Figura 28 – Gel SDS-PAGE 12% de proteínas intracelulares em diferentes concentrações de *M. canis* após tratamento com DMSO ou 4NC.** Ordem de aplicação: 1- peso molecular padrão. 5- DMSO 696 ug/mL. 6- 4NC 696 ug/mL. 7- DMSO 320 ug/mL. 8- 4NC 320 ug/mL. 9- DMSO 120 ug/mL. 10- 4NC 120 ug/mL



Comparando-se os poços 5 (célula tratada com DMSO) e 6 (célula tratada com 4NC) presentes na **Figura 28**, observa-se o aparecimento de duas bandas, uma

aproximadamente em 139 kDa, marcada pela letra “D” e a outra pouco abaixo de 30 kDa, marcada pela letra “E”).

As bandas diferencialmente expressas, tanto as que apareceram como desapareceram, foram recortadas e analisadas por LC-MS/MS.

Dentre os genes analisados nos estudos envolvendo antifúngicos na busca por mecanismos de resistência, é normal destacar os envolvidos na biossíntese do ergosterol, os ligados a esterases e o Tru MDR 2, pertencente a classe de transportadores ABC, responsáveis por codificar bombas de efluxo que tentam evitar o acúmulo de drogas no fungo (FACHIN *et al.*, 2001, DIAO *et al.*, 2009 & PAIÃO *et al.*, 2007 & PERES *et al.*, 2010 & SEGATO *et al.*, 2008 & ZHANG *et al.*, 2009). Outros mecanismos citados são a expressão de genes ligados à formação de tubulinas (ZOMORODIAN *et al.*, 2007) ou que atuem no metabolismo do enxofre, reduzindo a incorporação deste na síntese de proteínas (UTHMAN *et al.*, 2005).

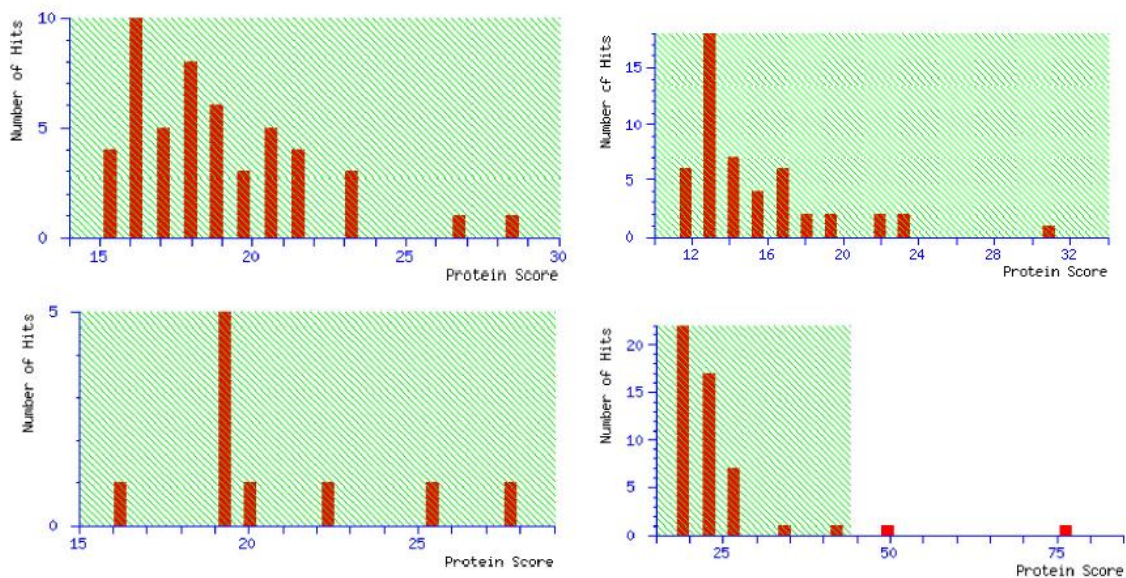
Durante a análise em LC-MS/MS não foi detectado nenhum fragmento nas amostras obtidas das bandas que estavam presentes no material secretado após tratamento com DMSO, mas que desapareceram após o tratamento com 4NC.

A análise dos fragmentos obtidos em LC-MS/MS foi realizada inicialmente pelo MASCOT. Os valores baixos de *score* em todas as amostras não permitiram a identificação (valores pelo menos acima de 54) de nenhuma proteína, com exceção da tripsina utilizada para digestão, conforme demonstrados na **Figura 29**. Os experimentos de separação das proteínas em gel de SDS e a análise em LC serão repetidos.

Experiências obtidas anteriormente de um dos grupos que trabalham em parceria demonstram que, mesmo com os valores de *score* baixos, quando se obtém uma cobertura acima de 80% das sequências, as proteínas sugeridas na maioria dos casos, são confirmadas com as obtidas, após repetição dos experimentos e adequação

dos valores de *score*. Com isso, mesmo sabendo que haverá a repetição dos experimentos, foi realizada uma análise prévia das sequências obtidas no secretoma, conforme demonstrado na **Tabela 9**.

**Figura 29 – Gráficos de distribuição espectral (score) obtida após análise pelo MASCOT.**



A análise das proteínas sugeridas para o secretoma obtido de *M. canis* após tratamento com 4NC é condizente com o perfil de estresse que o modelo de estudo induz. Além disso, a cepa utilizada foi obtida de isolado clínico, portanto o paciente já deveria ter passado por diversos tratamentos e é uma cepa que possui os fatores de resistência intrínsecos e facilitados para ativação quando em situação de estresse.

Os estudos de estresse e resistência a drogas em *M. canis* são incipientes dentro do campo da proteômica e genômica. Em *T. rubrum*, estudos anteriores verificaram um fenótipo parecido ao MDR (*multi drug resistance*) após tratamento com antifúngicos comerciais. Esse fenótipo está associado a um aumento na expressão de glicoproteínas presentes na membrana que agem como bomba de efluxo dependente de ATP para reduzir o acúmulo das drogas no meio intracelular (FACHIN *et al.*, 1996). Foi identificado o gene *TruMDR1* em *T. rubrum*, um gene codificador de transportadores

**Tabela 9** - Análise proteômica parcial do secretoma de *Microsporium canis* de sequências com cobertura acima de 80%

Peptídeos	Proteína identificada (Uniprot)	Cobertura	Microorganismo	Identificação	Similaridade em <i>Microsporium canis</i> (Broadinstitute)	Função (UniProt)
EWGPGPLRLWLLSS HYR	Uncharacterized protein	100.0%	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	A0A0C3CDD8_H EBCY	MCYG_07861 - multidrug and toxin extrusion protein 1	Transportador de efluxo. Resistência a drogas
LLVRGPDEP EEKPASDVHEQLVP PR	Putative ABC transporter	60%	<i>Aspergillus ruber</i>	A0A017S231_9E URO	MCYG_02947 - hypothetical protein MCYG_00587 - minor	Proteína transportadora que age como bomba de efluxo
MCGCVGVISNVDE NFQVK	Pc22g23440 protein	100.0%	<i>Penicillium chrysogenum</i>	B6HVT1_PENC W	histocompatibility antigen H13 MCYG_05483.2: eukaryotic translation initiation factor 3	Catálise da hidrólise de ligações alfa-peptídeos em cadeias polipeptídicas
IMELENQLSKLHEL K	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	EIF3B_PICGU	MCYG_04435 - DNA ligase	Iniciação de fator de tradução
NLQLFMENKQPDD DLFDR	DNA ligase	83.3%	<i>Aspergillus oryzae</i>	I8TWM6_ASPO3	MCYG_05930 - DNA topoisomerase 1	Participa na replicação de DNA
VSINTAAVTHPEFV HEAAER	Putative uncharacterized protein	90.0%	<i>Candida tenuis</i>	G3B1F3_CANTC	MCYG_01261.2: polyamine transporter TPO5	Participa no enovelamento do DNA
MQQGFFTQVQACP TCR	Putative uncharacterized protein	81,80%	<i>Bionectria ochroleuca</i>	A0A0B7K7P9_BI OOC	MCYG_07728.2: E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin-A	Transportador de poliaminas pela membrana
VIEGHSMVDESLITG EAMPVAK	Zinc finger RING-type protein	100%	<i>Macrophomina phaseolina</i>	K2R8I7_MACPH	MCYG_00353.2: copper-sulfate regulated protein 1	Protege a célula de apoptose induzida por estresse do retículo endoplasmático
NMNMPDGKQLQVPF ESSSK	Similar to P-type ATPase	86.7%	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	G2YXH4_BOTF4	MCYG_01234 - hypothetical protein	Regulação via ATP/ADP
DGNDITKSMTK	Trs 130p (Saccharomyces cerevisiae P283)	100%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C7GRD3_YEAS2	MCYG_01772.2: cysteinyl-tRNA synthetase	Família de proteínas TMEM1
	Cysteine--tRNA ligase	100%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SYC_YEAST		Ligação de um aminoácido para um tRNA

VDAHTDNGQMRW EGK	Esterase/lipase/thio esterase	100%	<i>Pyrenophora tritici- repentis.</i>	B2VUT5_PYRTR	MCYG_05769.2: esterase/lipase/thioest erase	Hidrolases
SHSKPPGDEA GDAF DCK	Uncharacterized protein	81.8%	<i>Hypocrea virens</i>	G9N544_HYPVG	MCYG_07746.2: AMP deaminase 2	Regula o acúmulo de ADP e AMP
LGGMFLEEFFTEEE QVLSLVFQK	Polyketide synthase, putative	100%	<i>Cordyceps militaris</i>	G3JPF3_CORM M	MCYG_07715.2: PKSN polyketide synthase for alternapyrone biosynthesis protein	Síntese de compostos cetônicos que podem ser tóxicos
EEGAGGGM GGGM GGMGGM GGM GGM DM	Molecular chaperone	90.5%	<i>Aspergillus oryzae</i>	Q2UUE6_ASPOR	MCYG_00958.2: DnaJ domain- containing protein	Auxiliam no enovelamento de proteínas
R.LGEHNIDVLEGNE QFINAAK.I	Uncharacterized protein	81.8%	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	K3VXX3_FUSPC	MCYG_05523 - hypothetical protein	Proteína da família fasciclina
HSIIVVA EGVSGIE FGDR	Uncharacterized protein	100%	<i>Agaricus bisporus</i>	K9HJB5_AGABB	No match	

de bomba de efluxo ABC, que é diferencialmente expresso na presença de compostos tóxicos, incluindo antifúngicos comerciais como griseofulvina, itraconazol, cetoconazol e fluconazol (CERVELATTI *et al.*, 2006 & FACHIN *et al.*, 2006).

As lacunas destacadas na Tabela 9, em especial, retratam proteínas normalmente associadas com uma tentativa de detoxificação da célula e degradação da droga que está causando danos à mesma. Em nosso estudo, foi verificado o aparecimento dessas proteínas transportadoras de efluxo (*multidrug and toxin extrusion protein 1* transportador ABC). Os fatores de tradução e a chaperona, que são proteínas enoveladoras capazes de corrigir a conformação proteica, provavelmente estejam relacionados à regulação dessas proteínas transportadoras de bomba de

efluxo. A produção de esterases pode estar ligada a uma resposta de resistência não específica através de um mecanismo de detoxificação da célula, como uma tentativa de degradar a droga citotóxica (FACHIN&CONTEL&MARTINEZ-ROSSI, 2001).

## 7 CONCLUSÕES

A análise de nossos resultados indicou que *P. umbellatum* demonstrou ser um bom alvo de pesquisa visando a atividade antifúngica. O 4NC demonstrou alta atividade antifúngica, porém alta citotoxicidade para as linhagens testadas. O extrato etanólico apresentou menor atividade antifúngica que o 4NC, porém não demonstrou citotoxicidade nas concentrações testadas, demonstrando ser um forte candidato para produção de um fitoterápico. A análise comparativa dos perfis proteicos por SDS PAGE após tratamento com 4NC demonstrou o aparecimento de bandas entre as proteínas intra e extracelulares, as quais serão submetidas a um estudo mais aprofundado.

## 8 REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [3 h] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- AJELLO, L. Geographic distribution and prevalence of the dermatophytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 89, n. 1, p. 30-38, 1960.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two organum species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALVAREZ, M. S.; SILVERBERG, N. B. Tinea capitis. **Cutis**, v. 78, n. 3, p. 189-196, 2006.
- AMORIM, C. Z.; FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES, A. D.; CORDEIRO, R. S. B. Screening for antimalarial activity in the genus *potomorphe*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 101-106, 1988.
- AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em hospital geral de porto alegre, brasil. Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in porto alegre, brazil. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.
- ATANASOVSKI, M.; TAL, E.; KADER, A.; HAMZAVI, F.; MEHREGAN, D. A. Neonatal dermatophytosis: Report of a case and review of the literature. **Pediatric dermatology**, v. 28, n. 2, p. 185-188, 2011.

- ATZORI, L.; ASTE, N.; ASTE, N.; PAU, M. Tinea faciei due to *microsporum canis* in children: A survey of 46 cases in the district of cagliari (italy). **Pediatric dermatology**, v. 29, n. 4, p. 409-413, 2012.
- AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2127-2130, 2000.
- BAEZA, L. C.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; GIANNINI, M. J. S. M. Cdna representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 12, p. 1415-1421, 2007.
- BAGATELA, B. S.; LOPES, A. P.; FONSECA, F. L. A.; ANDREO, M. A.; NANAYAKKARA, D. N.; BASTOS, J. K.; PERAZZO, F. F. Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from the aerial parts of *piper umbellata* l.(piperaceae). **Natural product research**, v. 27, n. 23, p. 2202-2209, 2013.
- BALDO, A.; CHEVIGNE, A.; DUMEZ, M.-E.; MATHY, A.; POWER, P.; TABART, J.; CAMBIER, L.; GALLEN, M.; MIGNON, B. Inhibition of the keratinolytic subtilisin protease sub3 from *microsporum canis* by its propeptide (prosub3) and evaluation of the capacity of prosub3 to inhibit fungal adherence to feline epidermis. **Veterinary microbiology**, v. 159, n. 3, p. 479-484, 2012a.
- BALDO, A.; MATHY, A.; TABART, J.; CAMPONOVA, P.; VERMOUT, S.; MASSART, L.; MARÉCHAL, F.; GALLEN, M.; MIGNON, B. Secreted subtilisin sub3 from *microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **British Journal of Dermatology**, v. 162, n. 5, p. 990-997, 2010.
- BALDO, A.; MONOD, M.; MATHY, A.; CAMBIER, L.; BAGUT, E.; DEFAWEUX, V.; SYMOENS, F.; ANTOINE, N.; MIGNON, B. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 218-223, 2012b.
- BALDO, A.; TABART, J.; VERMOUT, S.; MATHY, A.; COLLARD, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Secreted subtilisins of *microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1152-1156, 2008.
- BALDOQUI, D. C. B., V.S.; FURLAN, M.; KATO, M.J.; MARQUES, M.O.M. Flavonas, lignanas e terpeno de *piper umbellata* (piperaceae). **Química Nova** v. 32 n. 5, p. 1107-1109, 2009.
- BAO, Y.-Q.; WAN, Z.; LI, R.-Y. In vitro antifungal activity of micafungin and caspofungin against dermatophytes isolated from china. **Mycopathologia**, v. 175, n. 1-2, p. 141-145, 2013.
- BARROS, L.; BARROS, P.; RÖPKE, C.; SILVA, V.; SAWADA, T.; BARROS, S.; BELFORT JR, R. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 8, p. 1129-1132, 2007.
- BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V. D.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. D. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *pothomorphe umbellata* l. Miq (pariparoba). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 53-61, 2005.
- BERGAMO, D. C. B. **Avaliação química dos componentes não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcatecol em potomorphe umbellata (piperaceae)**. 2003. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Araraquara. Instituto de Química
- BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- BROHEM, C.; SAWADA, T.; MASSARO, R.; ALMEIDA, R.; RIVELLI, D.; ROPKE, C.; DA SILVA, V.; DE LIMA, T.; CURI, R.; BARROS, S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 1, p. 111-119, 2009.
- BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; FETT, T.; LOSSON, B.; GERDAY, C.; MIGNON, B. Purification and characterization of a 43.5 kda keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 269-275, June 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://mmy.oxfordjournals.org/content/39/3/269.abstract> >.
- BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; MONOD, M.; VERMOUT, S.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5676-5683, 2002.
- CARRILLO-MUNOZ, A.; GUGLIETTA, A.; PALACIN, C.; CASALS, J.; DEL VALLE, O.; GUARDIÀ, C.; RODRÍGUEZ, V.; QUINDÓS, G. In vitro antifungal activity of sertaconazole compared with nine other drugs against 250 clinical isolates of dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. **Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 308-313, 2004.
- CARRILLO-MUÑOZ, A.; QUINDOS, G.; RUESGA, M.; DEL VALLE, O.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J.; SANTOS, P. In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with sensitive yeast onetm. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 293-297, 2006.
- CERVELATTI, E. P.; FACHIN, A.; FERREIRA-NOZAWA, M.; MARTINEZ-ROSSI, N. Molecular cloning and characterization of a novel abc transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. **Medical mycology**, v. 44, n. 2, p. 141-147, 2006.
- CHEN, B. K.; FRIEDLANDER, S. F. Tinea capitis update: A continuing conflict with an old adversary. **Current opinion in pediatrics**, v. 13, n. 4, p. 331-335, 2001.
- CHEN, J.; YI, J.; LIU, L.; YIN, S.; CHEN, R.; LI, M.; YE, C.; ZHANG, Y.-Q.; LAI, W. Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. **Microbial pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 57-61, 2010.
- CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 385-405, 2008.
- CLSI. **Reference method for broth dilution antifungals susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard 2nd ed. . M38-A2**. CLSI. Wayne, PA. 2008.
- COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.
- DA SILVA, I. F.; DE OLIVEIRA, R. G.; SOARES, I. M.; DA COSTA ALVIM, T.; ASCÊNCIO, S. D.; DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 137-143, 2014.
- DA SILVA PINTO, A. C.; SILVA, L. F. R.; CAVALCANTI, B. C.; MELO, M. R. S.; CHAVES, F. C. M.; LOTUFO, L. V. C.; DE MORAES, M. O.; DE ANDRADE-NETO, V. F.; TADEI, W. P.; PESSOA, C. O. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2731-2735, 2009.
- DA SILVA RODRIGUES, G.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; PEREIRA, E. F.; CRUZ, R. C. B. Tinea capitis em adulto por *Trichophyton violaceum* no Brasil: Relato de um caso e revisão da literatura tinea capitis in adult caused by *Trichophyton violaceum* in

- brazil: Report of case and review of literature. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 6, p. 544-548, 2008.
- DE ANDRADE, N. S.; DE SOUZA, M. R.; PERAZZO, F. F.; BASTOS, J. K.; MAISTRO, E. L. Evaluation of the mutagenic potential of a water-ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* (piperaceae) aerial parts on wistar rats cells by the comet and micronucleus assay. **Cytologia**, v. 70, n. 4, p. 399-405, 2005.
- DE OLIVEIRA, H. C.; DA SILVA, J. F.; MATSUMOTO, M. T.; MARCOS, C. M.; DA SILVA, R. P.; DA SILVA, R. A. M.; LABATE, M. T.; LABATE, C. A.; ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. M. Alterations of protein expression in conditions of copper-deprivation for *Paracoccidioides lutzii* in the presence of extracellular matrix components. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 302, 2014.
- DE OLIVEIRA PEREIRA, F.; MENDES, J. M.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical mycology**, v. 51, n. 5, p. 507-513, 2013.
- DECARLI, L.; LARIZZA, L. Griseofulvin. **Mutation Research**, v. 195, n. 2, p. 91-126, Mar 1988. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988M335500001 >.
- DESCAMPS, F.; BROUTA, F.; MONOD, M.; ZAUGG, C.; BAAR, D.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed in vivo. **Journal of investigative dermatology**, v. 119, n. 4, p. 830-835, 2002.
- DIAO, Y.; ZHAO, R.; DENG, X.; LENG, W.; PENG, J.; JIN, Q. Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. **Medical mycology**, v. 47, n. 3, p. 237-247, 2009.
- EMMONS, C. W. Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 30, n. 3, p. 337-362, 1934.
- ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside b isolated from *Phytolacca tetramera* hauman. **Journal of natural products**, v. 71, n. 10, p. 1720-1725, 2008.
- ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Research in microbiology**, v. 155, n. 3, p. 144-153, 2004.
- FACHIN, A.; CONTEL, E.; MARTINEZ-ROSSI, N. Effect of sub-mics of antimycotics on expression of intracellular esterase of *Trichophyton rubrum*. **Medical mycology**, v. 39, n. 1, p. 129-133, 2001.
- FACHIN, A. L.; FERREIRA-NOZAWA, M. S.; MACCHERONI, W.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Role of the abc transporter *trmDr2* in terbinafine, 4-nitroquinoline *N*-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1093-1099, 2006.
- FACHIN, A. L.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. **Mycopathologia**, v. 135, n. 3, p. 141-143, 1996.
- GHAHFAROKHI, M. S.; GOODARZI, M.; ABYANEH, M. R.; AL-TIRAIHI, T.; SEYEDIPOUR, G. Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7, p. 645-655, 2004.
- GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; GUEYE, S. A.; SALVETTI, S.; SENESI, S.; BULGHERONI, A.; MAILLAND, F. Potential of ergosterol synthesis inhibitors to

- cause resistance or cross-resistance in trichophyton rubrum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2825-2829, 2014.
- 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, n. 8, p. 3081-3092, 2007.
- GINTER-HANSELMAYER, G.; WEGER, W.; ILKIT, M.; SMOLLE, J. Epidemiology of tinea capitis in europe: Current state and changing patterns. **Mycoses**, v. 50, n. s2, p. 6-13, 2007.
- GOGOSZ, A. M.; BOERGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero piper (piperaceae). **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 63, n. 2, 2012.
- GONG, J.; LIU, X.; XU, H.; ZENG, X.; CHEN, W.; LI, X. Deep dermatophytosis caused by trichophyton rubrum: Report of two cases. **Mycoses**, v. 50, n. 2, p. 102-108, 2007.
- GREGORÍ VALDÉS, B. S. Estructura y actividad de los antifúngicos. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 39, p. 1-1, 2005. Disponível em: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000200012&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012&nrm=iso)>.
- GROVER, C.; ARORA, P.; MANCHANDA, V. Comparative evaluation of griseofulvin, terbinafine and fluconazole in the treatment of tinea capitis. **International journal of dermatology**, v. 51, n. 4, p. 455-458, 2012.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-367, 2008.
- GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. Hiv inhibitory natural products. 6. The peltatols, novel hiv-inhibitory catechol derivatives from pothomorpe peltata. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 2809-2811, 1992.
- GYGI, S. P.; RIST, B.; AEBERSOLD, R. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 396-401, 2000.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. [antibacterial constituents against helicobacter pylori of brazilian medicinal plant, pariparoba]. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 122, n. 4, p. 291-294, 2002.
- JANUÁRIO, V. A. **Estudo químico e farmacológico de pothomorpe umbellata(L.) miq.** 1994. Dissertação de mestrado núcleo de pesquisa de produtos naturais, UFRJ
- JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-265, Apr 2004. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220558900010 >.
- JOUSSON, O.; LÉCHENNE, B.; BONTEMS, O.; CAPOCCIA, S.; MIGNON, B.; BARBLAN, J.; QUADRONI, M.; MONOD, M. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes trichophyton and microsporium. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 301-310, 2004.
- KIJJOA, A. G., A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O.R.; GOTTLIEB, H.E. . Gottlieb 4-nerolidylcatechol from pothomorpe umbellata. **Planta medica**, v. 39, p. 85-87, 1980.

- LACAZ, C. D. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de micologia médica**: SciELO Brasil 2002.
- LÉCHENNE, B.; REICHARD, U.; ZAUGG, C.; FRATTI, M.; KUNERT, J.; BOULAT, O.; MONOD, M. Sulphite efflux pumps in *aspergillus fumigatus* and dermatophytes. **Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 905-913, 2007.
- LOPES, A. P.; BAGATELA, B. S.; ROSA, P. C.; NANAYAKKARA, D. N.; CARLOS TAVARES CARVALHO, J.; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K.; PERAZZO, F. F. Antioxidant and cytotoxic effects of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from aerial parts of *pothomorphe umbellata* l.(piperaceae). **BioMed research international**, v. 2013, 2012.
- LORENZI, H.; DE ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no brasil: Nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. ISBN 8586714186.
- MARANHÃO, F. C.; PAIÃO, F. G.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microbial pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 166-172, 2007.
- MARANHÃO, F. C.; SILVEIRA, H. C.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Isolation of transcripts overexpressed in the human pathogen *trichophyton rubrum* grown in lipid as carbon source. **Canadian journal of microbiology**, v. 57, n. 4, p. 333-338, 2011.
- MARICHAL, P.; BOSSCHE, H. V. Mechanisms of resistance to azole antifungals. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION-**, v. 42, p. 509-516, 1995.
- MARINHO, C. **Características anatômicas, histoquímicas das estruturas secretoras e ontogenia de idioblastos da folha de pothomorphe umbellata (l.) miq.(piperaceae)**. 2008. 59p. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Botânica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.[Links]
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-383, 2008.
- MARTINEZ, D. A.; OLIVER, B. G.; GRÄSER, Y.; GOLDBERG, J. M.; LI, W.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MONOD, M.; SHELEST, E.; BARTON, R. C.; BIRCH, E. Comparative genome analysis of *trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **MBio**, v. 3, n. 5, p. e00259-00212, 2012.
- MATHY, A.; BALDO, A.; SCHOOF, L.; CAMBIER, L.; DEFAWEUX, V.; TABART, J.; MARÉCHAL, F.; SYMOENS, F.; MIGNON, B. Fungalsin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Veterinary microbiology**, v. 146, n. 1, p. 179-182, 2010.
- MESQUITA, J.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.; LOMBARDI, J.; OLIVEIRA, A. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de piperaceae. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 6-12, 2005.
- MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHÉLIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase i activity. **Planta medica**, v. 65, n. 4, p. 376-378, 1999.
- MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 285-294, 2008.
- MONOD, M.; LÉCHENNE, B.; JOUSSON, O.; GRAND, D.; ZAUGG, C.; STÖCKLIN, R.; GROUZMANN, E. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *trichophyton rubrum*. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 145-155, 2005.

- MORAES, M. D. S.; OLIVEIRA, F. D.; MANCINI, B.; AKISUE, M. K.; AKISUE, G. Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga pariparoba: *Pathomorphe umbellata* (L) miq. **Rev. ciênc. farm**, v. 8, p. 77-90, 1987.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- OSBORNE, C. S.; LEITNER, I.; HOFBAUER, B.; FIELDING, C. A.; FAVRE, B.; RYDER, N. S. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical trichophyton rubrum isolate resistant to terbinafine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2234-2236, 2006.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGIANI, J. N.; ODDS, F. C.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 719-727, 2010.
- PAIÃO, F. G.; SEGATO, F.; CURSINO-SANTOS, J. R.; PERES, N. T.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Analysis of trichophyton rubrum gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS microbiology letters**, v. 271, n. 2, p. 180-186, 2007.
- PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do brasil: Estudo farmacognóstico de heckeria umbellata (L) kunth. **Mem. Inst. Butantan**, v. 15, p. 59-68, 1941.
- PERAZZO, F. **Estudo químico-farmacológico dos extratos e princípios ativos obtidos da espécie medicinal pothomorphe umbellata (piperaceae)**. 111p. 2006. Tese.(Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto
- PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H.; LOPES, W.; CARDOSO, L. G.; CARVALHO, J. C.; NANAYAKKARA, N. D.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from pothomorphe umbellata (piperaceae) aerial parts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 215-220, 2005.
- PEREA, S.; RAMOS, M. J.; GARAU, M.; GONZALEZ, A.; NORIEGA, A. R.; DEL PALACIO, A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. **Journal of clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3226-3230, 2000.
- PERES, N. T.; SANCHES, P. R.; FALCÃO, J. P.; SILVEIRA, H. C.; PAIÃO, F. G.; MARANHÃO, F. C.; GRAS, D. E.; SEGATO, F.; CAZZANIGA, R. A.; MAZUCATO, M. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte trichophyton rubrum. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39, 2010.
- PINTO, A.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.; MORAES, M.; MORAES, M.; CAVALCANTI, B.; NUNOMURA, S.; POHLIT, A. In vitro cytotoxicity of pothomorphe peltata (L) miquel (piperaceae) isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. **Rev Bras Pl Med**, v. 8, p. 205-211, 2006.
- The plant list. 04/12/2014 2013. Disponível em: <  
<http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/kew-2571246> >.
- REBOLLO, N. L.-B., A.P. ARENAS, R. Tinea capitis. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 99, p. 91-100, 2008.
- REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Herbario Barbosa Rodrigues, 1970.
- ROCHA E SILVA, L. F.; SILVA PINTO, A. C.; POHLIT, A. M.; QUIGNARD, E. L. J.; VIEIRA, P. P. R.; TADEI, W. P.; CHAVES, F. C. M.; SAMONEK, J. F.; LIMA, C. A. J.; COSTA, M. R. F. In vivo and in vitro antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1181-1188, 2011.
- RODRIGUES, E.; NOGUEIRA, N.; ZOCOLO, G.; LEITE, F.; JANUARIO, A.; FUSCO-ALMEIDA, A.; FACHIN, A.; DE MARCHI, M.; DOS SANTOS, A.;

- PIETRO, R. Pothomorphe umbellata: Antifungal activity against strains of trichophyton rubrum. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 3, p. 265-269, 2012.
- ROPKE, C.; SAWADA, T.; DA SILVA, V.; MICHALANY, N.; DE MORAES BARROS, S. Photoprotective effect of pothomorphe umbellata root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical and experimental dermatology**, v. 30, n. 3, p. 272-276, 2005.
- ROPKE, C. D.; DA SILVA, V. V.; KERA, C. Z.; MIRANDA, D. V.; DE ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by pothomorphe umbellata root extract. **Photochemistry and photobiology**, v. 82, n. 2, p. 439-442, 2006.
- ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; DA SILVA, V. V.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. Pothomorphe umbellata extract prevents  $\alpha$ -tocopherol depletion after uv-irradiation. **Photochemistry and photobiology**, v. 78, n. 5, p. 436-439, 2003.
- SACOMAN, J.; MONTEIRO, K.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G.; FOGGIO, M.; CARVALHO, J. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from pothomorphe umbellata. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 5, p. 411-415, 2008.
- SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J.-P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 335-352, 2008.
- SEGATO, F.; NOZAWA, S. R.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Over-expression of genes coding for proline oxidase, riboflavin kinase, cytochrome c oxidase and an mfs transporter induced by acriflavin in trichophyton rubrum. **Medical mycology**, v. 46, n. 2, p. 135-139, 2008.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Guanabara Koogan, 1999. ISBN 8527704951.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.
- SILVA, C.; BOMFIM, F.; DOS SANTOS, M.; VELOZO, E. Estudo fitoquímico e avaliação in vitro da atividade anti-trypanosoma cruzi cepa y de pilocarpus spicatus st. Hil.(rutaceae). **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 4, p. 812-818, 2014.
- SILVA, R. A. D. **Pharmacopéia dos estados unidos do brasil**. São Paulo Cia. Ed. Nac., 1926.
- SMITH, M. P. W.; BANKS, R. E.; WOOD, S. L.; LEWINGTON, A. J.; SELBY, P. J. Application of proteomic analysis to the study of renal diseases. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 12, p. 701-712, 2009.
- SOUZA, L.; FERNANDES, O.; PASSOS, X.; COSTA, C.; LEMOS, J.; SILVA, M. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in goiania, brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 68-71, 2010.
- SRIRANGANADANE, D.; WARIDEL, P.; SALAMIN, K.; FEUERMAN, M.; MIGNON, B.; STAIB, P.; NEUHAUS, J. M.; QUADRONI, M.; MONOD, M. Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic ph. **Proteomics**, v. 11, n. 22, p. 4422-4433, 2011.
- SUBISSI, A.; MONTI, D.; TOGNI, G.; MAILLAND, F. Ciclopirox. **Drugs**, v. 70, n. 16, p. 2133-2152, 2010.
- TABOPDA, T. K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.-C.; TANOLI, S. A. K.; KHAN, S. N.; ALI, M. S.; NGADJUI, B. T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M.-A. Bioactive aristolactams from piper umbellatum. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1726-1731, 2008.

- TOSTI, A.; PIRACCINI, B.; STINCHI, C.; COLOMBO, M. Relapses of onychomycosis after successful treatment with systemic antifungals: A three-year follow-up. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 197, n. 2, p. 162-166, 1997.
- UTHMAN, A.; DOCKAL, M.; SÖLTZ-SZÖTS, J.; TSCHACHLER, E. Fluconazole upregulates scone expression and inhibits sulphur metabolism in *microsporum canis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 719-725, 2005.
- VALADARES, M.; REZENDE, K.; PEREIRA, E.; SOUSA, M.; GONÇALVES, B.; DE ASSIS, J.; KATO, M. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1975-1978, 2007.
- VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MONOD, M.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Rna silencing in the dermatophyte *microsporum canis*. **FEMS microbiology letters**, v. 275, n. 1, p. 38-45, 2007.
- VOISARD, J.; WEILL, F.; BEYLOT-BARRY, M.; VERGIER, B.; DROMER, C.; BEYLOT, C. Dermatophytic granuloma caused by *microsporum canis* in a heart-lung recipient. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 198, n. 3, p. 317-319, 1998.
- WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.
- WHITE, T. C.; OLIVER, B. G.; GRÄSER, Y.; HENN, M. R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.
- YUNKER, T. The piperaceae of brazil z. Sao paulo. **Hoehnea**, v. 3, p. 29-284, 1973.
- ZAUGG, C.; MONOD, M.; WEBER, J.; HARSHMAN, K.; PRADERVAND, S.; THOMAS, J.; BUENO, M.; GIDDEY, K.; STAIB, P. Gene expression profiling in the human pathogenic dermatophyte *trichophyton rubrum* during growth on proteins. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 2, p. 241-250, 2009.
- ZHANG, W.; YU, L.; YANG, J.; WANG, L.; PENG, J.; JIN, Q. Transcriptional profiles of response to terbinafine in *trichophyton rubrum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1123-1130, 2009.
- ZOMORODIAN, K.; UTHMAN, U.; TARAZOOIE, B.; REZAIIE, S. The effect of griseofulvin on the gene regulation of  $\beta$ -tubulin in the dermatophyte pathogen *trichophyton rubrum*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 6, p. 373-379, 2007.

ANEXO I - LAUDO TÉCNICO PARTES AÉREAS DE *P. umbellatum*

Sítio da Mata

Laudo Técnico

Rodovia Cajuru | Cassia dos Coqueiros | Fone/Fax: (16) 2133.4466  
Nº Inscr. Prod.: 024.308.176

**Produto:** Caapeba - Ras -CAAPEBA RAS

**Nome Científico 1:** Pothamorphe umbellata

**Nome Científico 2:**

**Família:** Piperaceae

**Origem (país):** Brasil

**Parte Utilizada:** Folhas

**Características Macro e/ou Microscópicas:**

muito ramificada, com hastes articuladas e providas de nós bem visíveis, de 1,0 - 2,5 cm de altura. Folhas amplas com base pregueadas. Flores pequenas e discretas de cor creme esverdeadas, multiplica-se por sementes.

**Referência Bibliog.:**

<b>Lote</b>	05SDM	<b>Cor:</b>	Verde
<b>Colheita:</b>	16/01/2013	<b>Validade:</b>	16/01/2016

**Descontaminação:** Congelamento por 10 dias

**Mét. de Secagem:** À sombra

**Umidade:** 7,9%

**Odor e Sabor:** Característico da Planta

**Obs.:** Por se tratar de insumo de origem vegetal, poderão ocorrer leves variações em sua cor, odor e sabor.

**Responsável**  
Ademar Menezes Jr.

Ademar Menezes Junior - CREA: 5060000803  
Eng. Agrônomo - (16) 2133.4455