



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIZ HENRIQUE ILKIU VIDAL

**ATIVIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS
SOBRE *Trichophyton rubrum***

Londrina
2008

LUIZ HENRIQUE ILKIU VIDAL

**ATIVIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS
SOBRE *Trichophyton rubrum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza

Londrina
2008

**Catlogação na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V648a Vidal, Luiz Henrique Ilkiu.
Atividade de extratos aquosos de plantas sobre *Trichophyton rubrum* /
Luiz Henrique Ilkiu Vidal. – Londrina, 2008.
53f. : il.

Orientador: José Roberto Pinto de Souza.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
2008.
Bibliografia: f.43-53.

1. Plantas medicinais – Teses. 2. Dermatófitos – Tratamento – Teses.
3. Fungos patogênicos – Controle – Teses. I. Souza, José Roberto Pinto de.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 579.873:615.89

LUIZ HENRIQUE ILKIU VIDAL

ATIVIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS
SOBRE *Trichophyton rubrum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza – UEL

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis – UEL

Prof. Dr. Lorivaldo Minelli – UEL

Profa. Dra. Andréa Diniz – UEL

Prof. Dr. Martin Homechin – UEL

Profa. Dra. Mirian Ribeiro Alves
(Suplente)UNIFIL

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago
(Suplente)UEL

Prof. Dr. José Roberto P. de Souza
Orientador – UEL

Londrina, 11 de agosto de 2008.

DEDICATÓRIA

“A todos que acreditam e tomam iniciativas para que possamos viver em um Mundo melhor.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todos os dias que já vivi e por todos os outros que ainda estarão por vir.

Sou muito grato aos meus pais, Luiz Cláudio e Deise e aos meus irmãos Duda e Thiago, pelo amor e carinho. À minha namorada Adriane, pelo simples fato do mundo ser muito melhor quando ela está do meu lado.

Agradeço ao meu orientador Prof. José Roberto, não só pela orientação neste trabalho, mas sobretudo por sua amizade a mais de uma década.

A professora Regina Quesada por toda paciência e dedicação no acompanhamento de um agrônomo “perdido” dentro de um hospital.

Ao prof. Martin Homechin, pela amizade e incentivo em procurar aplicações práticas para os conhecimentos sobre as plantas medicinais.

Agradeço muito ao Programa de Pós-Graduação do curso de Agronomia e a Universidade Estadual de Londrina, por todo o conhecimento, amizades e oportunidades que me proporcionaram.

Aos amigos e colegas que sempre me incentivaram a ir avante.

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, como meu amigo Chila e a Mayumi no início dos pré-testes, a Silvieli pela colaboração na montagem das diversas baterias de testes, os técnicos dos laboratórios de Fitoquímica e de Ciência dos Alimentos e muitas outras “almas caridosas” que estão sempre prontas para ajudar o próximo.

“Tente mudar o mundo, pois por mais que nenhuma das coisas que faça tenha uma enorme repercussão, um simples ato de bondade ou gesto de carinho serão lembrados para sempre por aqueles que aguardavam por isso!”

ILKIU-VIDAL, Luiz Henrique. **Atividade de extratos aquosos de plantas sobre *Trichophyton rubrum***. 2008. 65p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Desde a pré-história os seres humanos e os microrganismos partilham uma vida em comum. Alguns destes organismos podem ser considerados benéficos ao homem, sendo utilizados como alimentos ou medicamentos. Entretanto, alguns outros são nocivos, podendo causar desde o apodrecimento de alimentos até doenças mortais. Dentre os microrganismos nocivos, existe um grupo de fungos causadores de doenças na pele, denominados dermatófitos, que englobam fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Estes fungos são os causadores de diversas infecções conhecidas como “tíñas”, que podem se desenvolver em diferentes partes do corpo humano e também de alguns animais. O controle destas doenças é bastante difícil, devido a resistências que estes organismos vem adquirindo pelo uso abusivo de medicamentos, e também devido a dificuldade de obter-se medicamentos que possam combater seu desenvolvimento, sem afetar a saúde do hospedeiro, uma vez que as células fúngicas possuem características muito semelhantes às dos seres humanos. Pesquisas buscando uma forma mais eficiente de controle destas infecções, que não causem efeitos adversos aos pacientes, apontam as plantas medicinais como uma fonte de recursos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Este projeto teve como objetivo a utilização de extratos vegetais aquosos visando o controle de fungos dermatófitos. Foram escolhidas para fazerem parte desta pesquisa *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Baccharis trimera*, *Chenopodium ambrosioides*, *Cymbopogon winterianus*, *Momordica charantia*, *Ocimum gratissimum*, *Plantago major*, *Porophyllum ruderale*, *Ruta graveolens*, *Salvia officinalis*, *Symphytum officinale* e *Tetradenia riparia*, plantas que apresentavam na literatura especializada ou eram citadas no conhecimento popular como contendo propriedades antifúngicas ou antimicrobianas. Os extratos aquosos foram produzidos com proporção planta:solvente 1:10 (p/v), os tratamentos foram realizados em placas de Petri de 80mm, com três concentrações de extratos (50, 100 e 200µg/ml) incorporados em ágar Sabouraud dextrose, havendo um tratamento controle, sem a adição de extrato. As placas, após inoculadas foram dispostas em estufa com temperatura constante de 30°C e as avaliações foram realizadas aos 3 e 7 dias após a inoculação. O crescimento dos inóculos foi medido de duas formas distintas, com o uso de régua e de uma grade, sendo que a metodologia da grade mostrou melhor desempenho por ser mais rápida e de fácil execução. Entre as plantas testadas destacaram-se os extratos de *Ocimum gratissimum* e de *Tetradenia riparia*, que na maior concentração testada na pesquisa conseguiram inibir o desenvolvimento dos inóculos.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Dermatófitos. Tinhas.

ILKIU-VIDAL, Luiz Henrique. **Activity of aqueous plants extracts on *Trichophyton rubrum***. 2008. 65p. Thesis (Doctor in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

From pre-historic humans and microorganisms share a life together. Some of these organisms may be considered beneficial to humans and is used as food or medicines. However, some others are harmful and can cause from the decay of food by deadly diseases. Among the harmful microorganisms, there is a group of fungi that cause diseases of the skin, called dermatophytes, which include fungi of the genera *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. These fungi are the cause of various infections known as "tinea", which can develop into different parts of the human body and also of some animals. The control of these diseases is very difficult because these bodies is acquiring resistance to the abuse of drugs, and also because of the difficulty to get drugs that can combat their development, without affecting the health of the host, since the fungal cells possess characteristics closely resembling those of humans. researches seeking a more efficient way of controlling these infections, which cause no adverse effects to patients, show the medicinal plants as a source of resources for the development of new medicines. This project aimed to the use of aqueous plant extracts seeking control of dermatophyte fungi. Were chosen to be part of this research *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Baccharis trimera*, *Chenopodium ambrosioides*, *Cymbopogon winterianus*, *Momordica charantia*, *Ocimum gratissimum*, *Plantago major*, *Porophyllum ruderale*, *Ruta graveolens*, *Salvia officinalis*, *Symphytum officinale* and *Tetradenia riparia*, plants that in literature or popular knowledge were quoted in as containing antimicrobial or antifungal properties. The aqueous extracts were produced with a proportion plant:solvent 1:10 (w/v), the treatments were performed in Petri dishes of 80mm, with three concentrations of extracts (50, 100 and 200µg/ml) embedded in Sabouraud dextrose agar, with a control treatment, without the addition of extract. The plates, after inoculation were arranged in a laboratory oven with constant temperature of 30°C and the evaluations were performed at 3 and 7 days after inoculation. The growth of inocula was measured in two different ways, using a ruler and a square grid, and the methodology of the grid showed better performance by being faster and easier implementation. Among the plants tested were the extracts of *Ocimum gratissimum* and *Tetradenia riparia*, in the highest concentration tested in the research managed to inhibit the development of inocula.

Keywords: Medicinal plants. Dermatophytes. Tineas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS GERAIS	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
1.3 HIPÓTESES.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 FUNGOS.....	14
2.1.1 Dermatófitos	16
2.1.1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	18
2.2 Antimicrobianos.....	19
2.2.1 Agentes Antifúngicos.....	23
2.3 PLANTAS MEDICINAIS	25
3 ARTIGO: ATIVIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS SOBRE <i>Trichophyton rubrum</i>	32
3.1 Resumo e Abstract.....	32
3.2 Introdução	34
3.3 Material e Métodos.....	36
3.4 Resultados e Discussão	41
3.5 Conclusões.....	50
4 CONCLUSÕES GERAIS	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais fazem parte da história da humanidade. Elas são empregadas na alimentação, práticas religiosas, folclore e na medicina. Há registros que comprovam que os chineses já utilizavam as plantas medicinais desde 3700 a.C. e acreditavam existir uma planta apropriada para o tratamento de cada doença. A utilização das plantas é baseada na crença popular e apesar do emprego empírico, muitas são utilizadas até hoje sem serem completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (COWAN, 1999; DE SOUZA et al., 2003; NIERO et al., 2003).

É crescente a utilização de plantas medicinais em todo o mundo. Os conhecimentos acumulados pela medicina convencional não são suficientes para responder à cura de diferentes doenças. Além disso, os melhores tratamentos e os mais especializados da medicina convencional são caros e podem trazer consigo um número maior de efeitos adversos (MENDELSON; BALICK, 1995; NEW ALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; SIMÕES et al., 2003).

O desenvolvimento dos medicamentos, até alcançarem as estruturas que conhecemos hoje em dia, ocorreu em diferentes etapas. Inicialmente os vegetais eram utilizados da maneira como eram encontrados no ambiente, e após passaram a ser concentrados para melhorar a intensidade e uniformidade de sua ação. À medida que os avanços da tecnologia nas áreas da química e da farmácia se impuseram, as substâncias ativas puderam ser isoladas e utilizadas também como protótipos de moléculas sinteticamente elaboradas (TYLER, 1999).

O potencial das plantas para fins alimentícios, medicinais e cosméticos vem sendo estudado com grande afinco em todo o mundo. Porém, apesar do Brasil apresentar reconhecida biodiversidade e possuir uma herança indígena quanto à utilização da flora nacional, apenas uma pequena parcela das plantas nativas foi devidamente estudada (ALMEIDA et al., 2002).

Segundo Fetrow e Ávila (1999), é difícil selecionar as espécies vegetais a serem investigadas quanto ao seu potencial farmacológico, levando-se em conta a imensa quantidade de espécies a serem exploradas. Por isso, os relatos da medicina popular demonstram-se eficazes na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas, auxiliando nas pesquisas com plantas medicinais

(MACIEL et al., 2002).

A resistência de patógenos frente ao uso inadequado de antimicrobianos e o aumento na incidência de infecções microbianas têm impulsionado a pesquisa com plantas medicinais para a descoberta de novos agentes com atividade antimicrobiana. Desta forma, uma grande parcela da população brasileira recorre a tratamentos alternativos de saúde, sendo a fitoterapia o principal deles. Entre os motivos para a escolha da fitoterapia estão: a presença de informações etnofarmacológicas sobre a flora, a grande aceitação pela população da medicina natural e o fácil acesso às plantas medicinais (CALIXTO et al., 2000).

Os fármacos disponíveis estão "perdendo" para a resistência que os microrganismos adquirem frente ao uso irracional e pouco seguro dos medicamentos, ou devido à toxicidade que provocam. Estudos que contribuam para a obtenção de fármacos de origem natural, seguros, estáveis, padronizados e eficientes poderão servir como modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos e mais específicos contra bactérias, fungos, helmintos, protozoários, vírus, ou ainda como antitumorais. Esta especificidade também contribui para que se reduzam efeitos colaterais e indesejáveis ao hospedeiro, o que muitas vezes, limita a terapia medicamentosa instituída aos pacientes (SARTORI et al., 2003).

Nas últimas décadas o uso indiscriminado de antimicrobianos levou ao surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes, impulsionando a comunidade científica à pesquisa nas áreas de química, farmacologia e microbiologia para descoberta de novos agentes antimicrobianos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL et al., 2002; SOUZA et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso de fitoterápicos como forma de reduzir os custos dos programas de saúde pública, provendo maior facilidade de acesso para a população menos favorecida, em especial nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (SILVA et al., 2002). Linhas de pesquisas têm sido desenvolvidas com êxito por diversos pesquisadores, baseadas em propriedades antinfeciosas e antiinflamatórias de muitas plantas de utilização consagrada pela medicina popular, as quais poderão contribuir inovadoramente na terapêutica antimicrobiana (YAMAMOTO; OGAWA, 2002; HOLETZ et al., 2002; ZACCHINO et al., 2003). Os produtos naturais são responsáveis direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos

disponíveis na terapêutica moderna e, considerando-se os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem pode chegar a aproximadamente 70% (PHILLIPSON, 2001; YUNES; CALIXTO, 2001).

Pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas ou de aprimorar fitoterápicos já existentes vêm reassumindo papel importante nos últimos anos. Colaboram para isso a grande aceitação popular para o uso de plantas medicinais e acima de tudo, a movimentação anual de enormes quantias na economia mundial, como o comércio de fitofármacos e a possibilidade de desenvolver novos medicamentos a partir de moléculas naturais. Das cerca de 250.000 espécies de plantas no mundo, menos de 10% foram exaustivamente investigadas com vistas ao descobrimento de propriedades terapêuticas. Para a realização de uma triagem preliminar podem ser pesquisadas não somente plantas empregadas diretamente na terapêutica, mas também aquelas que possam constituir matérias primas das preparações fitoterápicas, ou fornecer intermediários para a fabricação de fármacos sintéticos (FERREIRA et al., 1998; SIXEL; PECINALLI, 2002).

Considerando a evolução de genes de resistência aos antimicrobianos (KÖLER; PECHÉRE; PLÉSIAT, 1999; LEE et al., 2003), componentes obtidos de plantas têm se tornado objeto de atenção e por essa razão, a indústria farmacêutica está se movimentando para a descoberta ou triagem de substâncias isoladas de plantas medicinais.

O uso de extratos ou compostos de plantas, ambos com conhecidas propriedades antimicrobianas, podem ser de grande significância em tratamentos terapêuticos. Nos últimos anos, um grande número de estudos tem sido conduzido em diferentes países, para determinar a atividade antimicrobiana de derivados de plantas (CVETNIC; VLADIMIR-KNEZEVIC, 2004; GHASEMI et al., 2004; LEE; EVERTS; BEYNEN, 2004; SOLÍS et al., 2004; VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2004; DE BOER et al., 2005; TSHIKALANGE; MEYER; HUSSEIN, 2005).

Estima-se que aproximadamente 50% dos fármacos empregados para o tratamento de infecções tanto bacterianas, fúngicas, parasitárias quanto virais, são de origem natural ou semi-sintéticas modificados para tomarem-se mais eficazes ou menos tóxicos, bem como 19,4% utilizaram produtos naturais como protótipos para medicamentos sintéticos (NEWMANN; CRAGG; SNADER, 2003).

A medicina popular e o conhecimento sobre o uso de plantas são o

resultado de influências culturais oriundas dos colonizadores europeus, indígenas e africanos. Baseando-se nas informações do uso popular das plantas, os cientistas podem direcionar a escolha das plantas que serão estudadas. Através dessas pesquisas, podem validar a utilização de plantas medicinais, facilitando o uso de medicamentos equivalentes ou complementares aos existentes no mercado, com qualidade farmacológica comprovada (AMORIM et al., 2003; DAS DORES et al., 2003).

1.1 OBJETIVO GERAL

Observar o efeito de extratos aquosos de diferentes espécies vegetais sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de inóculos de fungos dermatófitos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Averiguar o potencial de inibição do crescimento e desenvolvimento *in vitro* de inóculos do fungo *Trichophyton rubrum* por extratos vegetais aquosos de espécies vegetais em diferentes concentrações, buscando selecionar extratos com potencial fungicida visando a utilização dos mesmos na elaboração de medicamentos para o tratamento de dermatofitoses a baixo custo.

Comparar os métodos de avaliação do crescimento dos inóculos utilizando a medida do diâmetro das colônias obtido com uma régua, ou através da análise morfométrica da contagem de interseções obtidas numa grade.

Evidenciar ao Microscópio Eletrônico de Varredura possíveis alterações no crescimento das colônias de *Trichophyton rubrum* em presença e na ausência dos extratos.

1.3 HIPÓTESES

Os extratos aquosos inibirão o crescimento dos inóculos;

Os extratos aquosos demonstrarão atividade fungistática ou fungicida;

Os métodos de avaliação do crescimento das colônias, régua ou grade, podem diferir quanto à precisão e à praticidade;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS

Entende-se por micologia o estudo dos fungos, sendo as infecções fúngicas conhecidas como micoses. As micoses mais freqüentes são causadas por fungos que podem fazer parte da microbiota normal do organismo e são inócuos a menos que, de alguma forma, haja comprometimento das respostas imunes do hospedeiro (MIMS et al., 1999). Com algumas exceções, os fungos implicados em doenças humanas são de vida livre na natureza. A maioria das micoses é adquirida em conseqüência de contatos acidentais, por inalação ou penetração traumática, a partir de uma fonte exógena (SCHAECHTER et al., 2002).

Fungos são organismos eucarióticos, com núcleo bem definido circundado por membrana nuclear; membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; parede celular; mitocôndrias; complexo de Golgi; ribossomas ligados ao retículo endoplasmático; e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários. Essa descrição mostra que os fungos são semelhantes às células hospedeiras, portanto é difícil elaborar estratégias terapêuticas específicas contra o parasita e que sejam ao mesmo tempo atóxicas para o hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

Estes microrganismos originam-se de uma única célula ou de um fragmento de hifa e estas unidades apresentam estruturas variadas, sendo que uma destas, é a parede celular. A parede celular fúngica é uma estrutura rígida que protege a célula de choques osmóticos, sendo composta, de modo geral, por glucanas, mananas, quitina, proteínas e lipídeos. A quitina é o principal componente estrutural da parede. Os lipídeos estão presentes como substâncias polares e apolares. Os principais lipídeos apolares são os triacilgliceróis e os esteróis, e os polares são os diacilglicerofosfolinas e diacilgliceroetanolaminas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A presença de quitina na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais.

O termo micose foi empregado pela primeira vez por Virchow, em 1856 (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008) e até hoje ocupam lugar de destaque na patologia tropical. Toda micose se inicia pela implantação no hospedeiro, de um fungo apto ao parasitismo. Os fungos, mecanicamente ou por meio de exoenzimas, principalmente proteases, determinam processos infecciosos que variam em extensão e em tipo anatomopatológico conforme o agente responsável pelos mesmos (LACAZ et al., 2002).

Nos últimos anos houve um aumento crescente das infecções fúngicas sistêmicas, não apenas por espécies conhecidas, mas também por aquelas consideradas inócuas (RANG; DALE, 1993; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2004).

Quando patogênicos, podem ser divididos com base na forma de crescimento ou conforme o tipo de infecção produzida. De acordo com a micose causada podem ser divididos em micose superficial ou micose profunda, de acordo com a forma de crescimento são classificados em filamentosos ou leveduriformes (MIMS et al., 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Fungos patogênicos para humanos são classificados em grupos de acordo com os tecidos primários que colonizam: agentes fúngicos que causam infecções superficiais, infecções cutâneas, doenças subcutâneas e doenças sistêmicas. Os fungos que causam infecções superficiais tendem a crescer apenas nas camadas mais externas da pele ou na cutícula da diáfise dos pêlos (MURRAY et al., 2004).

Uma das mais promissoras fontes de pesquisa, para novos compostos biológicos ativos são plantas usadas na medicina tradicional, muitas delas ainda não investigadas do ponto de vista da composição química ou de sua atividade farmacológica (ZACCHINO et al., 1998; URBINA et al., 2000; ZACCHINO, 2001; SARTORI et al., 2003).

O atual interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos pode ser parcialmente explicado pelo aumento acentuado do número de casos de AIDS e subsequente supressão do sistema imune em pacientes doentes. Por exemplo, mais de 90% dos pacientes HIV-positivos adquirem uma infecção fúngica durante o curso da doença. Em particular, algumas formas de dermatoses são causa de grande morbidade em pacientes recebendo quimioterapia antineoplásica, transplantados e nos extremos de idade como idosos e neonatos

(SELITRENNIKOFF et al., 1992; SCHLEMPER et al., 1998; BLOCK et al., 1998; PHILLIPS; STEVENS; VIVIANI, 2001; LACAZ et al., 2002). Estas infecções são produzidas por um grupo de fungos que caracteristicamente infectam áreas queratinizadas do corpo e freqüentemente são de difícil erradicação, sendo que a obtenção de novos e efetivos agentes antifúngicos tópicos são necessários (ZACCHINO et al., 1998; ZACCHINO, 2001; PHILLIPS; STEVENS; VIVIANI, 2001).

As micoses cutâneas, também denominadas dermatofitoses são produzidas pelos fungos dermatófitos, que vivem às custas da queratina da pele, pêlo, unhas e mucosas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Esses agentes podem ser adquiridos através do contato com solos contaminados, animais ou humanos infectados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

2.1.1 Dermatófitos

A expressão dermatófito é utilizada para designar grupo de fungos que em vida parasitária vivem à custa de queratina da pele, unhas e pêlos. Os dermatófitos enquadram os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Os dermatófitos são fungos que colonizam as camadas epidérmicas queratinizadas e estabelecem uma reação infecciosa quando associados ao hospedeiro. Essas infecções são geralmente cutâneas e restritas a derme. As doenças causadas por dermatófitos são as tinhas. O termo *tinea* deriva da palavra latina que significa verme, e refere-se a lesões serpiginosas que caracterizam essas infecções. Esse termo é utilizado em associação à parte do corpo acometida, seguidas do nome do sitio atingido como: tinha da cabeça (do couro cabeludo), tinha da barba, tinha do corpo, tinha das mãos, tinha dos pés entre outras (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; ZAITZ et al., 1998; SCHAECHTER et al., 2002).

Todas as manifestações clínicas desta patologia estão relacionadas com a inflamação da epiderme, da derme e dos folículos pilosos. Esse processo é desencadeado por uma reação imunologicamente mediada pelos antígenos

fúngicos que se difundem a partir da epiderme infectada (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

As diferentes espécies de dermatófitos possuem variados nichos ecológicos (LACAZ et al., 1998). De acordo com a adaptação ao parasitismo, os dermatófitos são classificados em antropofílicos, melhor adaptados ao homem como *Trychophyton rubrum*; zoofílicos, parasitas primitivamente de animais como *Microsporum canis* e geofílicos, encontrados mais freqüentemente no solo, ocasionalmente parasitas do homem e de animais, como o *Microsporum gypsum* (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

As micoses cutâneas são doenças da pele, pêlos e unhas. Em geral, são restritas às camadas queratinizadas do tegumento e seus apêndices. Ao contrário das infecções superficiais, podem ser produzidas várias respostas imunes celulares nas infecções cutâneas, causando alterações patológicas no hospedeiro, que podem manifestar-se nos tecidos mais profundos da pele. A intensidade da resposta parece estar diretamente relacionada com o estado imunológico do hospedeiro e com a cepa ou espécie de fungo envolvido na infecção (MURRAY et al., 2004).

Existem diversos mecanismos que dificultam a penetração do fungo no indivíduo, tais como a descamação normal da pele que tende a eliminar os dermatófitos, assim como os ácidos graxos que têm ação antifúngica. Da mesma forma, no soro humano há inibidores do desenvolvimento destes agentes: a transferrina insaturada e a macroglobulina alfa 2, os quais impedem a ação da queratinase do dermatófito sobre a queratina da epiderme. Com a progressão da infecção, desenvolve-se a imunidade celular, a qual pode ser evidenciada pela reação à tricofitina, assim como pelo eventual aparecimento das dermatofitides. Surgem também no sangue, anticorpos específicos, entretanto, a imunidade humoral é de pouco valor e a imunidade celular é a maior responsável pela defesa do organismo. Assim, o quadro clínico das dermatofitoses varia de acordo com a região ou anexo do corpo comprometido (SAMPAIO, 1997).

Os dermatófitos transformam o material queratinofílico em material nutritivo, utilizando-o também para sua implantação no hospedeiro. Por outro lado, produzem elastases, dentre outras enzimas, que lhes permitem agir sobre a elastina, o que também auxiliaria na sua instalação (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Na pele, os dermatófitos causam, geralmente, lesões descamativas, circulares, com bordos eritematosos, microvesiculosas, de propagação radial, com tendência à cura central. Na unha, a infecção inicia-se pela borda livre, podendo atingir a superfície e área subungueal. As unhas tomam-se branco-amareladas, porosas e quebradiças, os agentes mais comuns são *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. No pêlo, os dermatófitos atacam a camada superficial, avançando até o folículo piloso. O pêlo perde o brilho, torna-se quebradiço. Lesão geralmente única, com grande capacidade inflamatória, representada por microabscessos, tem como agentes mais comuns *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum* (MARCHISIO; PREVE; TULLIO, 1996).

Os hábitos ambientais e culturais associados aos tipos de roupas e calçados contribuem para a incidência de dermatofitoses. Estudos realizados em populações institucionalizadas e famílias mostram que as condições de vida em aglomerações constituem fatores importantes na disseminação das infecções. Os fatores imunológicos também contribuem para a sua incidência, e as evidências sugerem que a resistência natural mediada por células a essas infecções é importante (SCHAECHTER et al., 2002).

As dermatofitoses estão entre as infecções mais prevalentes no mundo. Embora possam ser persistentes e incômodas, na maioria dos casos não são debilitantes nem potencialmente fatais, embora anualmente sejam gastos milhões de dólares no seu tratamento (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

2.1.1.1 *Trichophyton rubrum*

O gênero *Trichophyton* é composto por diversas espécies, dentre as quais destaca-se pela frequência de isolamento *T. rubrum*, que pode produzir praticamente todos os quadros clínicos de dermatofitoses, tendo como características principais a tendência para cronicidade e a resistência aos tratamentos convencionais (LACAZ et al., 1998).

Quanto à classificação, *T. rubrum* é um fungo filamentosos que produz colônias brancas ou avermelhadas e reverso com pigmento avermelhado

difundido no agar, daí seu nome. Pode apresentar macroconídios e microconídios, estes últimos, microscopicamente possuem a forma de lágrimas, são de paredes delgadas, lisas, são muito abundantes e apresentam uma distribuição alternada nas hifas. *T. rubrum* é o agente etiológico das tinhas do corpo, da barba, inguinal, dos pés, das mãos e onicomicoses das mãos e dos pés. É considerada uma espécie antropofílica, de distribuição mundial, atingindo cerca de 40% dos casos de tinha. Este fungo pode infectar os pêlos e a pele. Processos inflamatórios causados por esses agentes são geralmente crônicos, algumas vezes com lesões profundas chamadas de granulomas tricofticos (FISHER; COOK, 2001; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.2 ANTIMICROBIANOS

O homem e os microrganismos partilham uma vida em comum que se perde na sombra do tempo, a qual, desde a pré-história resulta em doenças ao homem. Entretanto as causas dessas doenças só começaram a ser descobertas, a partir de 1878, graças aos trabalhos de Pasteur e Koch, que demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades do homem e animais (MIMS et al., 1999; TAVARES, 2001).

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de aproximadamente 3.000 anos atrás, quando os médicos chineses utilizavam bolores para tratar tumores e feridas infeccionadas. Os sumérios recomendavam emplastos com a mistura de vinho, cerveja, zimbros e ameixa. A descoberta de novos agentes antimicrobianos costumava ser uma questão meramente casual. Durante a idade média, substâncias de origem vegetal, animal e mineral continuaram a ser utilizadas sem o conhecimento maior de suas propriedades químico-farmacêuticas, confundindo-se freqüentemente a medicina com a magia (TAVARES, 2001).

O uso de substâncias químicas e derivadas de plantas é tão antigo quanto a humanidade, mas somente com o desenvolvimento da alquimia a partir do século XVI, as drogas medicinais passaram a ser obtidas por métodos laboratoriais. Inicialmente, foram testados fenóis, cresóis, formol e outras substâncias químicas, as quais se comportaram de forma eficiente na destruição dos microrganismos,

porém de forma não seletiva, restringindo assim, seu uso na terapêutica anti-infecciosa devido à toxicidade que provocavam às células hospedeiras. A pesquisa planejada conduziu à descoberta das primeiras substâncias que, utilizadas em doses adequadas, eram capazes de destruir os microrganismos sem destruir as células humanas (MIMS et al., 1999; TAVARES, 2001; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

No início do século XX, surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. As descobertas de Ehrlich e seus contemporâneos revolucionaram a terapêutica e provocaram o desenvolvimento da pesquisa e da indústria químico-farmacêutica objetivando a obtenção de novas substâncias medicamentosas sintetizadas em laboratório. Paul Ehrlich elaborou as primeiras teorias sobre mecanismo de ação dos fármacos antimicrobianos (DE SOUZA et al., 2003).

Os primeiros agentes anti-infecciosos importantes, não eram verdadeiros antibióticos, mas sim pré-metabólitos sintéticos. Como por exemplo o prontossil que *in vivo* é metabolizado em sulfonamida. A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de utilidade clínica, por Alexander Fleming em 1928, deu início à era da antibióticoterapia. O resultado final desse progresso científico refletiu-se na mudança da expectativa de vida para pacientes portadores de várias doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e de alta mortalidade (TAVARES, 2001; SCHAECHTER et al., 2002).

Os fármacos utilizados no tratamento de patologias infecciosas são agentes antibióticos, análogos dos antibióticos ou quimioterápicos. Antibióticos são substâncias anti-infecciosas, de origem natural, produzidas metabolicamente por microrganismos. Os análogos dos antibióticos são produzidos por vegetais ou animais. Já os quimioterápicos são substâncias antimicrobianas sintéticas. O agente terapêutico deve alcançar o sítio de infecção em concentração suficiente para inibir ou eliminar o agente infeccioso, com toxicidade mínima para o hospedeiro (FONSECA, 1999; DE SOUZA et al, 2003).

Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos e bactérias, inclusive actinomicetos capazes de impedir o crescimento de microrganismos de forma reversível ou irreversível. Embora muitos dos agentes antimicrobianos sejam derivados de produtos naturais, a maioria deles são modificados quimicamente a fim de aprimorar as propriedades antimicrobianas ou farmacológicas (MIMS et al., 1999).

Algumas substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, por serem muito tóxicas, são utilizadas apenas topicamente. Para uso interno, a droga antimicrobiana deve possuir toxicidade seletiva, ou seja, ser tóxica apenas para o microrganismo e não para o hospedeiro. A relação entre a toxicidade para o agente e para o organismo hospedeiro é chamada de índice terapêutico. Sabe-se que muitos antifúngicos são nefro e hepatotóxicos, o que pode ser muitas vezes mais grave do que a própria patologia causada pelo agente microbiano, o que exige cuidado no seu uso (BLACK, 1996; LACAZ et al., 2002; SCHAECHTER et al., 2002).

A terapêutica antiinfeciosa constitui-se num dos campos de maior impacto dos avanços da tecnologia e da obtenção de soluções para problemas da área médica. Novos antimicrobianos foram descobertos, e continuam a ser procurados visando maior potência, menor toxicidade, melhor comportamento farmacocinético e ação decisiva contra agentes infecciosos resistentes a drogas anteriormente ativas (TAVARES, 2001).

A quimioterapia sulfamídica e a penicilina impulsionaram as pesquisas e começaram a surgir por síntese orgânica ou biossíntese, novas substâncias ou fármacos com espectro de ação não só para bactérias, mas também com atividades antifúngicas que atuavam por via tópica ou sistêmica em diversas micoses (LACAZ et al., 2002).

O agente antimicrobiano ideal deve exibir toxicidade seletiva, a qual pode ser função de um receptor específico necessário para a ligação do fármaco, ou pode depender da inibição de eventos bioquímicos essenciais para o microrganismo, mas não para o hospedeiro. Isto deve ocorrer, com maior probabilidade, nos organismos procariotos do que nos eucariotos, em função do maior grau de diferença com as células hospedeiras (MIMS et al., 1999).

Diferentes fatores influenciam no curso de uma determinada infecção e conseqüentemente na terapia, dentre elas a concentração do agente antimicrobiano, suas propriedades farmacológicas, a patologia da lesão e seu ambiente bioquímico, bem como o comportamento metabólico do microrganismo. Destes vários fatores, a susceptibilidade inerente dos microrganismos é o objeto para a medida direta *in vitro*, e fornece um ponto de referência para selecionar a terapia mais apropriada (DE SOUZA et al., 2003).

A atividade de substâncias antimicrobianas pode ser dividida em três etapas: as substâncias precisam associar-se aos microrganismos e penetrar nas

suas células; precisam ser transportadas para um sítio alvo intracelular, e por último, ligam-se a seus sítios alvos bioquímicos específicos. A resistência a essas substâncias pode ocorrer em cada uma dessas etapas. Os mecanismos de resistência clinicamente relevantes, incluem a síntese de enzimas que inativam a droga, prevenção do acesso ao sítio alvo (inibição da absorção ou aumento da excreção), ou modificação do sítio alvo (SCHAECHTER et al., 2002).

Durante a elaboração de novos agentes antimicrobianos deve-se levar em consideração tanto a atividade antimicrobiana, quanto as propriedades farmacológicas do agente antimicrobiano frente ao hospedeiro. Dentre as propriedades desejadas para um novo agente antimicrobiano podem ser citadas: seletividade para o alvo, atóxico para o hospedeiro, meia vida longa no plasma, baixa ligação às proteínas plasmáticas, ausência de interferência com outros fármacos, entre outras (MIMS et al., 1999; LACAZ et al., 2002; ZACCHINO et al., 2003).

O uso desenfreado de agentes antimicrobianos pode ter contribuído para a resistência dos microrganismos a estes agentes. Associado a esse uso inadequado e a resistência, ocorreu um aumento dramático de infecções, principalmente fúngicas, como resultado das imunodeficiências associadas à AIDS, quimioterapia anticancerígena, transplantes, idosos e neonatos (ZACCHINO, et al., 2003).

O problema da resistência microbiana é crescente, e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Entretanto, podem ser tomadas ações para reduzir este problema, por exemplo, controlar o uso de antimicrobianos, desenvolver pesquisas para melhor entender os mecanismos genéticos de resistência, e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

Atualmente, a pesquisa, a descoberta e a produção de novos agentes antimicrobianos revelam-se crescentes e necessárias. O risco do surgimento de microrganismos resistentes pode acontecer facilmente e representa um risco clínico importante. Processos genéticos de seletividade podem conduzir ao aparecimento de "super microrganismos". As medidas defensivas a serem tomadas incluem a busca por novos agentes antimicrobianos (MIMS et al., 1999; LIMA, 2001; TAVARES, 2001; SCHAECHTER et al., 2002).

2.2.1 Agentes Antifúngicos

Os antifúngicos existentes no mercado atualmente possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se leva em consideração os efeitos colaterais como a nefro e a hepatotoxicidade. Entre alguns exemplos de antifúngicos que apresentam efeitos tóxicos cita-se a anfotericina B e o cetoconazol. O fato de alguns antifúngicos apresentarem ação fungistática e não fungicida, podem contribuir para o surgimento de cepas resistentes. (RANG; DALE; RITTER, 1997; ZACCHINO et al., 2003).

Os agentes antifúngicos podem ser divididos em três categorias:

a) Fármacos que afetam a membrana celular (inibidores dos esteróides da membrana fúngica)(DE SOUZA et al., 2003);

b) Fármacos que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais: como síntese de DNA, RNA ou proteínas (SCHAECHTER et al., 2002);

c) Fármacos que inibem a síntese da parede celular fúngica (ZACCHINO et al., 2003).

Os fungos possuem paredes celulares, sendo esta uma estrutura essencial para eles, diferentemente das células dos mamíferos, e este fato faz com que todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformem em alvo útil para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos com maior especificidade (LÓPEZ et al., 2001; ZACCHINO, 2001; SELITRENNIKOFF, 2001). Infelizmente, as células fúngicas e humanas apresentam muitas semelhanças. Compartilham a maioria das vias de metabolismo intermediário, utilizando enzimas muito similares não sendo fácil encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para obter-se um antifúngico seguro. Os alvos que apresentam maior possibilidade de levar a antifúngicos seletivos são os inibidores da biossíntese do ergosterol, a inibição das topoisomerasas fúngicas e a inibição da parede celular fúngica (URBINA et al., 2000; ZACCHINO, 2001; LACAZ et al., 2002).

A técnica de se utilizar a parede celular fúngica como alvo é extremamente útil para detectar antifúngicos seletivos e, portanto não tóxicos para o hospedeiro, surgiu recentemente. Já que a parede celular fúngica é uma barreira

protetora, evita a ruptura osmótica e confere forma aos fungos, sendo também essencial para seu crescimento e viabilidade. A parede celular é constituída por muitos componentes macromoleculares, entre eles β -glicanos, quitina, manoproteínas e outras proteínas. Uma vez sintetizados, eles interagem entre si, via uma série de enzimas associadas à parede, realizando-se ligações cruzadas, ramificações e outras funções. Três atividades enzimáticas têm demonstrado serem essenciais para a formação da parede celular fúngica: 1,3 β -glicano sintetase; 1,6 β -glicano sintetase e quitina sintetase as quais catalisam a formação de 1,3 e 1,6- β -glicanos e quitina respectivamente, sendo portanto, alvos atrativos para o descobrimento de novos fármacos antifúngicos (ZACCHINO et al., 2003).

Antifúngicos podem atuar inibindo a biossíntese do ergosterol. Em uma via metabólica de síntese que inicia com a acetilcoenzima A, são envolvidas várias enzimas até a formação do ergosterol para fungos e o colesterol para animais. Os antifúngicos que atuam nessa via metabólica, infelizmente inibem enzimas que são comuns para a formação tanto do ergosterol quanto colesterol. Devido a essa não seletividade desses agentes, a síntese do colesterol em mamíferos acaba sendo interrompida, provocando efeitos colaterais como inibição de síntese hormonal (URBINA et al., 2000; ZACCHINO et al., 2003).

Como exemplos de drogas que atuam na membrana celular podem ser citados os derivados poliênicos e imidazólicos. Estas substâncias combinam-se com esteróis da membrana, rompendo a mesma ou tomando-a incapaz de efetuar suas funções normalmente (permeabilidade e transporte). A droga forma um poro na membrana e o centro hidrófilo da molécula cria um canal iônico transmembrana. Podem ocorrer alterações na permeabilidade celular e causar a perda de constituintes essenciais das células como K^+ , açúcares, proteínas, fosfatos orgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfato (RANG; DALE; RITTER, 1997; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Entre os numerosos fatores que afetam a atividade antimicrobiana *in vitro*, é necessário considerar os seguintes aspectos: pH e composição do meio, estabilidade do fármaco, tamanho do inóculo, tempo de incubação e atividade metabólica dos microrganismos, uma vez que eles influenciam significativamente no resultado dos testes (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos e imunocomprometidos que se tornaram mais suscetíveis a infecção, ocorreu um

aumento da utilização de agentes antimicóticos. Sabe-se que seu uso é limitado, tendo em vista a sua toxicidade e seu tempo de tratamento prolongado. A toxicidade dos agentes antifúngicos existentes atualmente é decorrente da semelhança entre as células do hospedeiro e dos fungos. Por isso, a maioria dos agentes antifúngicos atuam também no funcionamento da célula do hospedeiro, ou seja, possuem baixa seletividade. Estes fatores levam a uma busca por antimicóticos mais efetivos, menos tóxicos e preferencialmente mais baratos (GALGIANI, 1987; RAHALISON; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; RAHALISON et al., 1994; GIORDANI et al., 1999, ZACCHINO et al., 1999; HADACEK; GREGER, 2000; ZACCHINO et al., 2003).

Existe um consenso geral de que são necessários novos agentes antifúngicos mais potentes, porém mais seguros. Para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas. Primeiramente, deve-se lembrar de que a célula fúngica é uma célula eucariótica, então o composto pode ser tóxico tanto para o microrganismo patogênico quanto para o paciente (GUNJI; ARIMA; BEPPU, 1983; FROST et al., 1995; ZACCHINO et al., 1998; ZACCHINO et al., 2003).

2.3 PLANTAS MEDICINAIS

Informações iniciais relacionadas à utilização empírica de plantas medicinais para fins terapêuticos são encontradas no Código de Hamurabi (2000 a.C.), no papiro de Ebers (1500 a.C.) e na obra Universo Medicina de Penadio Dioscorides (40-90 d.C). Entretanto, a pesquisa sistemática, envolvendo o isolamento dos princípios ativos vegetais iniciou-se no século XIX, quando o farmacêutico alemão Friediech Wilhelm Setürner procurava no ópio, a substância responsável por sua ação hipnótica (SIANI, 2003).

As plantas são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de medicamentos. Para a obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos avanços tecnológicos

atuais, ainda é restrita. Isso possibilita entender que os compostos químicos presentes nas plantas possam vir a se tornar fármacos com potencial para as mais diferentes moléstias (NODARI; GUERRA, 2003).

Apesar do uso de plantas para fins medicinais ter sido praticado por séculos em muitas partes do mundo, a sua validação e de seus benefícios pelos economistas tem chamado atenção apenas nas duas últimas décadas, possivelmente devido a alarmante razão de espécies em extinção. A avaliação pode também ajudar no planejamento de uma política pública própria para a conservação e uso sustentável dos recursos naturais (KUMAR, 2004).

A quantidade de plantas existentes no planeta, reconhecida sob o ponto de vista científico, situa-se entre 250 a 500 mil espécies, sendo que somente cerca de 5% têm sido estudadas quanto as características fitoquímicas e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). O valor da biodiversidade, principalmente nas florestas tropicais, tem sido muito discutido pela indústria farmacêutica, devendo-se considerar ainda que os tratamentos baseados em produtos naturais são de uso corrente por 80% da população mundial (JOYCE, 1994; BIAVATTI, 2001; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de plantas tem permitido descobrir muitos fármacos clinicamente úteis no tratamento de muitas doenças. No Brasil apenas 8% das espécies vegetais nativas foram estudadas em busca de moléculas bioativas (AMORIM et al., 2003).

O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais tem provocado renovado interesse pelo conhecimento das características das substâncias delas originadas, bem como sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras, considerando a extensa e diversificada flora do país (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é tradicional e amplo, e a cada dia vem se tornando mais comum devido à disseminação da moda naturalista, bem como ao alto custo dos produtos farmacêuticos industrializados (SILVA et al., 2002).

No estudo de uma planta quanto às suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de

metabólitos, que são importantes para o seu desenvolvimento: os produtos dos metabolismos primário e os do secundário. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, entre outros. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, gerados das vias acetato-malonato e do acetato-mevalonato, relacionados aos processos adaptativos. São sintetizados a partir de metabólitos primários, em distribuição restrita a certas plantas e microrganismos (às vezes característico de um dado gênero ou espécie); e caracterizados por uma enorme diversidade química, incluindo as drogas antibacterianas originais, como Penicilina e Estreptomicina (NIERO et al., 2003).

Os metabólitos secundários foram originalmente considerados como paralelos ao metabolismo essencial da célula, e freqüentemente como produtos meramente residuais do metabolismo. Acredita-se agora que eles desempenham muitas funções importantes na planta, embora a total função da maioria não seja completamente entendida. (RON; WILLS; MORGAN, 2000; SIMÕES et al., 2003).

Muitas "curas" de doenças são atribuídas aos metabólitos secundários presentes nas plantas. Estes são constituídos por uma variedade de substâncias bioativas, e nos dias atuais o interesse científico por essas substâncias tem aumentado devido à busca por novos medicamentos oriundos de plantas para repor as drogas em desuso por resistência (BASILE et al., 1999, 2000; SATO et al., 2003; PAIVA et al., 2003).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (TAVARES, 2001; COELHO et al., 2004). As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos e poliacetilenos, que são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies e cujas funções até pouco tempo eram desconhecidas (COWAN, 1999; CLARKE et al., 2001; SIMÕES et al., 2003; SOUZA et al., 2003).

Entre os principais grupos de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, Cowan (1999) realizou uma grande revisão bibliográfica e destacou que os princípios ativos fenólicos (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas,

flavonóides, flavonas, flavonóis, taninos e cumarinas), terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, lectinas, polipeptídeos e poliacetilenos como os produtos de maior ação antimicrobial produzidos e armazenados nos tecidos vegetais. Estes metabólitos agem de maneira a evitar a penetração e o estabelecimento de patógenos, atuando de diversas formas, como inativando enzimas, formando complexos com as paredes celulares, promovendo a ruptura de membranas, complexando íons metálicos, interagindo com o DNA dos microrganismos, entre outras ações.

Com o avanço das pesquisas foram atribuídas às referidas substâncias, importâncias relevantes nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (LIMA, 2001; NIERO et al., 2003). Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata a agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematóides, ou em função de determinados estímulos como radiações, agentes químicos e outras injúrias. As plantas podem produzir e estocar um grande número de metabólitos secundários em diferentes órgãos vegetais como folhas, caules, raízes, flores e sementes, variando de espécie para espécie (GNANAMANICKAM, 1981; LIMA, 1996; YUNES; CALIXTO, 2001).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por diferentes processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, bem como a extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais, via de regra, originaram medicamentos em menor tempo, com custos muitas vezes inferiores e conseqüentemente mais acessíveis à população (BRITO; BRITO, 1993; UGAZ, 1994).

Pesquisas têm comprovado a utilização de diferentes espécies de plantas medicinais no tratamento de infecções (SAVI et al., 1997; COWAN, 1999; LIMA, 2001; SCHLEMPER et al., 2001; NADINIC et al., 2002; ZACCHINO et al., 2003; COELHO DE SOUZA et al., 2004). O uso de plantas medicinais no mundo,

principalmente na América do Sul, contribui significativamente com cuidados para com a saúde. Muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica (HOLETZ et al., 2002; COELHO DE SOUZA et al., 2004), por isso a necessidade de validar cientificamente o uso das mesmas.

Dados da OMS demonstram que cerca de 80% da população mundial utiliza algum tipo de vegetal na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% dá-se por indicação médica. Por outro lado, é preocupante o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico. São várias as publicações que registram o uso medicinal das plantas, sem apresentar dados comprobatórios de suas propriedades terapêuticas (SIMÕES, 2003).

Embora várias plantas sejam utilizadas ou comercializadas com finalidades terapêuticas, a grande maioria não possui dados científicos que comprovem a sua eficácia e seu espectro toxicológico no homem, assim como a garantia da qualidade do produto ou de sua produção (FERREIRA et al., 1998).

Diante da enorme variedade de espécies da flora que são consideradas popularmente medicinais, e da possibilidade de inúmeras outras com igual potencial e nunca pesquisadas, é importante estabelecer critérios de seleção que atendam aos objetivos da investigação. Uma triagem preliminar pode a princípio, separar plantas que efetivamente sejam ativas (SIXEL; PECINALLI, 2002).

Alguns princípios podem ser utilizados para planejar a seleção das plantas que serão objeto de estudo, como por exemplo (MAGISTRETTI, 1980):

1- Reestudo da planta de acordo com algumas propriedades farmacológicas já descritas na literatura. Constitui uma forma prática pela seleção de espécies existentes e já reconhecidas pelas suas propriedades medicinais.

2- Levantamento ecológico, ou seleção da planta num habitat particular, ou por intermédio de indicação sugestiva de efeitos em animais.

3- Seleção aleatória ou randômica seguida de bioensaios. Esta seleção é conduzida por coleta arbitrária de espécies representativas dos diversos grupos taxonômicos de uma região. Do material obtido são preparados extratos, que são analisados *in vivo* ou *in situ*, com a finalidade de encontrar amostras com efeitos farmacológicos significativos.

4- Seleção por critérios quimiotaxonômicos. O reconhecimento da

estrutura química de um princípio ativo encontrado em um vegetal, como sendo o fator responsável pelos seus efeitos farmacológicos pode estabelecer uma importante referência na procura deste composto ou compostos semelhantes. Diversas plantas aparentadas fitogeneticamente, e que podem se assemelhar do ponto de vista químico, pela presença de tais metabólitos secundários embora em concentrações variadas, podem ser pesquisadas.

5- Seleção através de investigações etnofarmacológicas. O fato de um expressivo número de indivíduos em uma população utilizar determinada planta na medicina tradicional pode ser considerado uma boa sugestão para uma investigação farmacológica. Parte do que se busca entender cientificamente sobre plantas medicinais foi legado pela medicina popular, através de conhecimentos adquiridos e preservados.

A validação da utilização de plantas medicinais depende da investigação sistemática realizada sob vários aspectos. Dentre esses aspectos podemos citar os aspectos químicos, farmacológicos, microbiológicos e citotóxicos que somados a outros irão resultar no medicamento fitoterápico (ROJAS et al., 1992; NIERO et al., 2003).

Várias plantas da flora brasileira são usadas na medicina natural, no tratamento de doenças tropicais, incluindo infecções fúngicas. Muitas são utilizadas com finalidade antisséptica, ou no tratamento de doenças infecciosas e estudos têm demonstrado que muitas vezes ocorre a confirmação da atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2000; HOLETZ et al., 2002; SARTORI et al., 2003). Por outro lado, devido ao desenvolvimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação adequada, as plantas medicinais são muitas vezes usadas de forma incorreta, não produzindo o efeito desejado. Visado evitar problemas relativos à toxicidade potencial de determinados extratos, uma série de exames laboratoriais envolvendo desde testes em cultura de tecidos específicos, em citocromos como o P450 e testes em animais, são realizados frequentemente em pesquisas que buscam novas substâncias oriundas de plantas, para a certificação de que a eficiência no controle de microrganismos não ponha em risco a saúde de quem opte por este tipo de tratamento (PEREIRA et al., 2004). Faltam trabalhos científicos que comprovem a eficácia no tratamento das enfermidades e recursos para o isolamento de substâncias ativas das plantas estudadas e para transformá-las em medicamentos (SILVA et al., 2002).

A medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para os mais diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (MITSCHER et al. 1972). Isto é justificado, em parte, pelo alto grau de aceitabilidade das plantas medicinais, bem como, a grande disponibilidade destes recursos, diferente do que ocorre com os medicamentos industrializados, que na maioria, dependem de tecnologia e matéria-prima externas (AMORIM et al., 2003).

Grande parte das matérias-primas de origem natural que suprem a nossa indústria farmacêutica provém de países com as mesmas condições climáticas encontradas no Brasil. O Brasil é um grande importador de produtos farmacêuticos sintéticos, semi-sintéticos e naturais (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Baseados no conhecimento empírico sobre as propriedades terapêuticas de algumas plantas, desenvolvem-se alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina científica, como os digitálicos, quinina, morfina, atropina, aspirina, entre outros (SIMÕES et al., 2003).

3. ARTIGO: ATIVIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS SOBRE *Trichophyton rubrum*

3.1 RESUMO

Infecções em seres humanos, principalmente aquelas envolvendo a superfície da pele e das mucosas, vem constituindo um problema bastante sério, especialmente em países tropicais e sub-tropicais em desenvolvimento. Entre os microrganismos infectantes, existe um grupo de fungos causadores de doenças na pele, denominados dermatófitos, que englobam fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Estes fungos são os causadores de diversas infecções conhecidas como “*tinhas*”, que podem se desenvolver em diferentes partes do corpo humano e também de alguns animais. O controle destas doenças é bastante difícil, devido à resistência que estes organismos vem adquirindo pelo uso inadequado de medicamentos, e também devido a dificuldade de obter-se medicamentos que possam combater seu desenvolvimento, sem afetar a saúde do hospedeiro, uma vez que as células fúngicas possuem características muito semelhantes às dos seres humanos. Pesquisas buscando uma forma mais eficiente de controle destas infecções, que não causem efeitos adversos aos pacientes, apontam as plantas medicinais como fonte de recursos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Entre os dermatófitos, a espécie *Trichophyton rubrum* se destaca, por ser relatado em vários artigos como sendo o maior causador de dermatofitoses, chegando em algumas localidades a ser responsável por cerca de 80% dos casos clínicos. Esta pesquisa teve como objetivo a utilização de extratos vegetais aquosos visando inibir o crescimento e desenvolvimento de inóculos de *T. rubrum*. Foram escolhidas para este estudo algumas plantas mencionadas na literatura especializada ou citadas no conhecimento popular como contendo propriedades antifúngicas ou antimicrobianas. Os extratos aquosos foram produzidos com proporção planta:solvente 1:10 (p/v), os tratamentos foram realizados em placas de Petri de 80mm, com três concentrações de extratos (50, 100 e 200µg/ml) incorporados em ágar Sabouraud dextrose, e um controle, sem a adição de extrato. As placas, após inoculadas foram incubadas em temperatura constante de 30°C e as avaliações foram realizadas aos 3 e 7 dias após a inoculação. O crescimento dos inóculos foi medido de duas formas distintas, com o uso de régua e de uma grade, sendo que a metodologia da grade mostrou melhor desempenho por ser mais rápida e de fácil execução. Entre as plantas testadas destacaram-se os extratos de *Ocimum gratissimum* e de *Tetradenia riparia*, que na maior concentração testada conseguiram inibir o desenvolvimento dos inóculos.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Dermatophytes, *Tinhas*.

3.1 ABSTRACT: Activity of aqueous plants extracts on *Trichophyton rubrum*

Infections in humans, especially those involving the surface of the skin and mucous membranes, has constituted a very serious problem, especially in tropical countries and sub-tropical developing countries. Among infectious microorganisms, there is a group of fungi that cause diseases of the skin, called dermatophytes, which include fungi of the genera *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. These fungi are the cause of various infections known as "tinea" that may develop in different parts of the human body and also of some animals. The control of these diseases is very difficult because of the resistance that these bodies is acquiring the inappropriate use of medicines, and also because of the difficulty to get drugs that can combat their development, without affecting the health of the host, since the fungal cells possess characteristics closely resembling those of humans. Researches seeking a more efficient way of controlling these infections, which cause no adverse effects to patients, show the medicinal plants as a source of resources for the development of new medicines. Among the dermatophytes, the species *Trichophyton rubrum* stands out, being reported in several articles as being the greatest cause of dermatophytosis, reaching in some districts to be responsible for about 80% of cases. This study aimed to the use of aqueous plant extracts inhibit targeting the growth and development of inocula of *T. rubrum*. Were chosen for this study some plants mentioned in literature or popular as cited in the note containing antimicrobial or antifungal properties. The aqueous extracts were produced with a proportion plant:solvent 1:10 (w/v), the treatments were performed in Petri dishes of 80mm, with three concentrations of extracts (50, 100 and 200µg/ml) embedded in Sabouraud dextrose agar, and a control without the addition of extract. The plates, after inoculation were incubated at constant temperature of 30 ° C and the evaluations were performed at 3 and 7 days after inoculation. The growth of inocula was measured in two different ways, using a ruler and square grid, and the methodology of the grid showed better performance by being faster and easier implementation. Among the plants tested were the extracts of *Ocimum gratissimum* and *Tetradenia riparia*, in the highest concentration tested successfully inhibit the development of inocula.

Keywords: Medicinal plants, Dermatophytes, *Tineas*.

3.2 INTRODUÇÃO

Infecções em seres humanos, principalmente aquelas envolvendo a superfície da pele e das mucosas, vem constituindo um problema bastante sério, especialmente em países tropicais e sub-tropicais em desenvolvimento, devido ao fato de que dermatófitos, fungos que compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyton*, aparecem como os patógenos mais frequentes (GURGEL et al., 2005).

Estes microrganismos invadem os extratos córneos da pele e outros tecidos queratinizados de humanos e animais produzindo as micoses denominadas “*tineas*” ou “*tinhas*”. Estima-se que 10 a 15% da população humana poderá ser infectada por estes microrganismos no decorrer de sua vida (MAZÓN et al., 1997; RUBIO et al., 1999; SIDRIM; MOREIRA, 1999). As micoses causadas pelos dermatófitos são de difícil erradicação, e resultam em um dos maiores problemas para os sistemas públicos de saúde (MEYERS, 1990; YOUNG; NAQVI; RICHARDS, 2005).

Dentre todos os dermatófitos, o fungo *Trichophyton rubrum* é o maior causador de dermatofitoses no Brasil, representando cerca de 80% dos casos clínicos destas micoses, registrados pelos órgãos de saúde (CHAN, 2002). Em estudos realizados em diferentes cidades brasileiras sobre a incidência de dermatofitoses, o predomínio de *T. rubrum* entre os dermatófitos, principalmente nas onicomicoses e *tinha pedis* foi observado por Terrarigni; Lasagni e Oriani (1993) e Mezzari (1998), confirmando que este fungo é o mais cosmopolita de todos.

Embora exista um conjunto de medicamentos para o tratamento de micoses tanto sistêmicas quanto superficiais, nenhum deles é ideal em termos de eficácia, segurança ou espectro antifúngico (DIDOMENICO, 1999; ABLORDEPPEY et al., 1999). Muitos destes medicamentos possuem efeitos indesejáveis ou são muito tóxicos (anfotericina B), permitem re-emergência, mostram interação com outros medicamentos (azóis) ou demonstram indícios do desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (fluconazol) (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). Existe a necessidade urgente de se descobrir novos antifúngicos, com diferentes estruturas químicas, novos modos de ação, maior ação do espectro fungicida e menores efeitos colaterais (ROJAS et al., 2003).

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças de pele, incluindo infecções micóticas, é uma prática antiga em algumas partes do mundo (IROBI; DARAMOLA, 1993). Este uso vem sendo feito através do isolamento de compostos antifúngicos de extratos vegetais. Estes compostos são metabólitos secundários e servem como agentes contra a invasão de microrganismos (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996). As plantas superiores produzem milhares de compostos químicos com diferentes atividades biológicas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Sabe-se que estes compostos possuem uma grande importância ecológica, pois podem agir como atrativos para polinizadores, até apresentarem defesas químicas contra insetos, herbívoros e microrganismos (HARBONE, 1990).

As plantas são capazes de detectar a presença de potenciais fitopatógenos (fungos, bactérias e vírus) e podem produzir compostos antifúngicos para se proteger contra ataques bióticos, o que pode ser essencial para uma resistência às infecções fúngicas (WOJTASZEK, 1997).

Apesar de sua contribuição significativa para a sociedade, a medicina tradicional vem recebendo pouquíssima atenção no desenvolvimento de pesquisas modernas, assim como poucos incentivos tem sido destinados para a renovação de práticas de saúde tradicionais em muitos países (TADEG et al., 2005). Embora haja muitas espécies de plantas utilizadas atualmente no Brasil para o tratamento de infecções mais corriqueiras, poucas pesquisas científicas tem sido realizadas tendo em vista o uso de plantas medicinais pelas comunidades que habitam as diferentes regiões do país, com diferentes floras (DUARTE et al., 2005).

Esta investigação científica teve como objetivo avaliar extratos de vegetais com propriedades medicinais, visando encontrar um composto natural como alternativa para o tratamento de dermatofitoses causadas pelo fungo *T. rubrum*, a um baixo custo e de fácil preparo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Local

Esta pesquisa foi realizada no Serviço Microbiológico de Controle de Infecção Hospitalar (SMCIH) do Laboratório de Microbiologia Clínica (LMC), do Hospital Universitário (HU), da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

3.3.2 Fungos Dermatófitos

As cepas dos fungos utilizados neste experimento foram adquiridas junto ao banco de microrganismos do LMC-HU, gentilmente cedidas pela Prof^a Regina Quesada. Tais fungos foram previamente identificados na rotina micológica do setor e estocados na micoteca do laboratório para posterior uso científico, sem que para isso tenham sido envolvidos pacientes específicos.

Desta forma, *T. rubrum* foi a cepa de fungo dermatófito selecionada para participar da presente pesquisa, em razão não só da grande frequência no isolamento deste agente em diversos materiais biológicos enviados para investigação, mas também, pela dificuldade encontrada para a erradicação definitiva desta cepa nas diversas dermatofitoses observadas.

As colônias de *T. rubrum* foram cultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud Dextrose, incubados por até 15 dias em temperatura de 30°C (\pm 1°C), para obtenção de máxima esporulação. O inóculo utilizado foi obtido através da agitação dos tubos contendo as colônias de *T. rubrum*, cobertos por solução fisiológica e agitados manualmente. A suspensão resultante foi separada e o valor de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtido através da contagem dos microconídios em câmara de Neubauer. O inóculo utilizado no experimento estava constituído de $7,7 \times 10^5$ UFC/mL da suspensão.

3.3.3 Plantas Medicinais

As plantas utilizadas na pesquisa foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Centro Universitário Filadélfia (UniFil), no Horto de Plantas Medicinais e nas áreas próximas ao viveiro de mudas do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UEL, nos meses de janeiro e fevereiro de 2008.

As plantas com características medicinais foram escolhidas por possuírem ação anti-microbiana e ou anti-fúngica descritas na literatura, como também em relatos populares de utilização destas espécies para estes fins.

As plantas selecionadas, seus nomes populares, estágio de desenvolvimento e partes que foram utilizadas para a confecção dos estratos estão descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1. Espécies, nomes populares, estágios de desenvolvimento e partes utilizadas. Londrina-PR, 2008.

Espécie	Nome popular	Estágio	Partes utilizadas
<i>Achillea millefolium</i>	Mil-folhas	Vegetativo	Folhas
<i>Artemisia absinthium</i>	Losna	Vegetativo	Ramos jovens
<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja	Vegetativo	Parte aérea
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Erva de Santa Maria	Reprodutivo	Folhas e infloresc.
<i>Cymbopogum winterianus</i>	Citronela	Vegetativo	Folhas
<i>Momordica charantia</i>	Melão de São Caetano	Reprodutivo	Folhas, flores e frutos
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca	Vegetativo	Folhas
<i>Plantago major</i>	Tanchagem	Vegetativo	Folhas
<i>Porophyllum ruderale</i>	Couvinha	Reprodutivo	Folhas e infloresc.
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	Vegetativo	Ramos jovens
<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia	Vegetativo	Folhas
<i>Symphytum officinale</i>	Confrei	Vegetativo	Folhas
<i>Tetradenia riparia</i>	Mirra	Vegetativo	Folhas

3.3.4 Preparação dos Extratos

Os extratos foram preparados nos laboratórios de Química de Produtos Naturais e de Ciência dos Alimentos na UEL.

Após colhidas, foram separadas as partes de interesse das plantas para a realização da pesquisa. As partes escolhidas foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada até atingirem peso constante, em temperaturas sempre menores ou iguais a 45°C.

Após a desidratação as plantas foram rasuradas e os pedaços resultantes de cada planta foram pesados. Em seguida foi adicionada uma quantidade de água destilada aquecida a temperatura de 80°C, a uma quantidade de matéria seca de plantas de forma a obter uma concentração de 25% (m/v). A infusão preparada foi deixada em repouso durante 10 minutos, seguida de turbólise, com o auxílio de um liquidificador industrial. O mosto resultante da turbólise foi filtrado em gaze para retirada das partículas maiores de planta restantes. Os extratos obtidos de cada uma das espécies selecionadas, foram armazenados em alíquotas em frascos de vidro âmbar e mantidos congelados (- 4°C) até o momento da utilização. O tempo de armazenamento dos extratos congelados foi menor que 65 dias.

3.3.5 Montagem dos tratamentos

Os tratamentos foram constituídos de três concentrações de extratos vegetais (50, 100 e 200µg de extrato) de cada espécie vegetal, diluídos no Agar Sabouraud, e aplicados em placas de Petri de 80mm. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata com uma testemunha, também em triplicata, sem a adição de nenhum extrato vegetal.

A mistura dos extratos ao meio de cultura foi realizada em ágar aquecido em banho maria (80°C) para que houvesse maior homogeneização. Após solidificação da mistura agar-extrato, três locais para inoculação da amostra foram pré-estabelecidos por marcas na placa de Petri e as cepas de *T. rubrum* foram inoculadas com o auxílio de uma alça plástica descartável, calibrada com 10µL de

inóculo.

Ao finalizar a inoculação de todas as placas, estas foram colocadas em uma estufa a temperatura de 30°C até o momento da realização da avaliação dos tratamentos.

3.3.6 Avaliação do Crescimento das Colônias

As leituras das placas foram realizadas a 3 e a 7 dias após a inoculação das placas com a avaliação do crescimento das colônias.

3.3.7 Coleta e Análise dos Resultados

As avaliações obtidas do desenvolvimento ou não das colônias de *T. rubrum* em meios de cultura contendo diferentes concentrações e espécies dos extratos vegetais foram realizadas de duas formas:

1ª - A colônia resultante do crescimento do inóculo teve sua área calculada através da obtenção do diâmetro médio da colônia. Após retirada de duas medidas de diâmetro perpendiculares com a utilização de uma régua graduada em milímetros foi possível calcular a área da circunferência;

2ª - A medida do crescimento do inóculo foi feita utilizando o princípio morfométrico de contagem de pontos com a utilização de uma grade quadriculada com distâncias entre as linhas de 0,5cm. Contou-se o número de pontos de intersecção das linhas da grade com a área ocupada pela colônia, e em seguida calculou-se o desenvolvimento da colônia segundo Bahmer e Lorenz (2000).

Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa Estatística 6.0. Como os dados coletados não apresentaram homogeneidade segundo o teste de Levene ($\alpha= 0,05$), eles foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha= 0,05$).

3.3.8 Microscopia Eletrônica

Amostras das colônias fúngicas dos tratamentos que demonstraram algum potencial de inibição do desenvolvimento dos inóculos foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura, no Laboratório de Microscopia eletrônica e Micro-análise, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG) da UEL.

Um fragmento da colônia de cada tratamento foi cortado com um tubo cilíndrico de vidro e fixado com 6% de glutaraldeído em uma solução tampão de cacodilato de sódio 0.1M, pH 6.8 por 15h a 4°C, e lavado com a solução tampão, pós-fixado overnight com tetróxido de ósmio 1%. Em seguida foi lavado novamente com tampão e desidratado em uma série alcoólica de etanol crescente de 70 a 100%. A desidratação foi finalizada no aparelho BAL-TEC CPD 030, Critical Point Dryer. Após a desidratação as amostras foram metalizadas no aparelho BAL-TEC SCD 050, Sputter Coater, para serem observadas no microscópio de varredura FEI Quanta 200.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos pré-testes realizados para certificação da eficiência dos extratos, as espécies *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Baccharis trimera*, *Chenopodium ambrosioides*, *Momordica charantia*, *Plantago major*, *Ruta graveolens* e *Salvia officinalis* não demonstraram efeitos fungicidas ou fungistáticos significativos sobre o inóculo de *T. rubrum* em nenhuma das concentrações testadas nesta pesquisa (dados não publicados).

O tamanho das colônias de *T. rubrum* avaliado, aos 3 e 7 dias, frente aos diferentes extratos vegetais, após a inoculação são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Médias do crescimento das colônias de *T. rubrum*, 3 e 7 dias após a inoculação, em diferentes tratamentos e concentrações, medidas com régua (R) e grade quadriculada (G). Londrina-PR, 2008.

Tamanho das colônias de <i>T. rubrum</i> (cm ²) aos 3 dias						
Tratamentos	50µg/mL		100µg/mL		200µg/mL	
	R	G	R	G	R	G
Controle	0,67	1,50	0,67	1,50	0,67	1,50
<i>C. winterianus</i>	0,18	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>O. gratissimum</i>	0,18	0,56	0,05	0,17	0,00	0,00
<i>P. ruderale</i>	0,30	0,83	0,28	0,50	0,14	0,38
<i>S. officinale</i>	1,13	1,72	0,82	1,36	0,00	0,00
<i>T. riparia</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tamanho das colônias de <i>T. rubrum</i> (cm ²) aos 7 dias						
Controle	3,48	3,70	3,48	3,70	3,48	3,70
<i>C. winterianus</i>	1,77	2,06	1,52	1,75	0,50	0,88
<i>O. gratissimum</i>	0,76	1,00	0,75	0,94	0,00	0,00
<i>P. ruderale</i>	3,18	3,44	1,40	1,72	0,80	1,17
<i>S. officinale</i>	3,45	3,92	3,26	3,89	1,54	2,03
<i>T. riparia</i>	0,76	1,19	0,52	1,08	0,00	0,00

Os efeitos antifúngicos dos extratos aquosos de algumas espécies testadas nesta pesquisa indicam a importância de muitas espécies vegetais como fontes de substâncias antimicóticas.

Os resultados obtidos apresentaram apenas diferenças numéricas entre os crescimentos dos inoculos quando comparam-se os valores obtidos com o método da régua e da grade, pois os dois métodos apresentaram os mesmos resultados.

Segundo Bhamer e Lorenz (2000), o princípio morfométrico da contagem de pontos, utilizando a grade quadriculada, é um método simples, barato e que pode ser utilizado em qualquer laboratório para realizar a medida de colônias, gastando menos tempo que a técnica de medida do diâmetro das colônias realizados com a régua. Estudos realizados por Weilbel (1979) e também por Gundersen e Jensen (1987), mostram que a estimativa de áreas através deste método já é há muito tempo aplicada em materias científicos e biológicos, ao contrario do que possa parecer, a contagem de pontos é matematicamente correta e precisa.

As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de extratos de plantas e a grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe ainda um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para extratos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (SIVROUPOULOU et al., 1995). Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial aqueles com níveis de inibições superiores. Propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de inibição do desenvolvimento de colônias, considerando como: forte inibição - até 500 µg/mL; inibição moderada - entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - acima de 1600 µg/mL (ALIGIANIS et al.,2001).

A comparação direta das avaliações realizadas pelos dois métodos empregados nesta pesquisa é apresentada na figura 3.1.

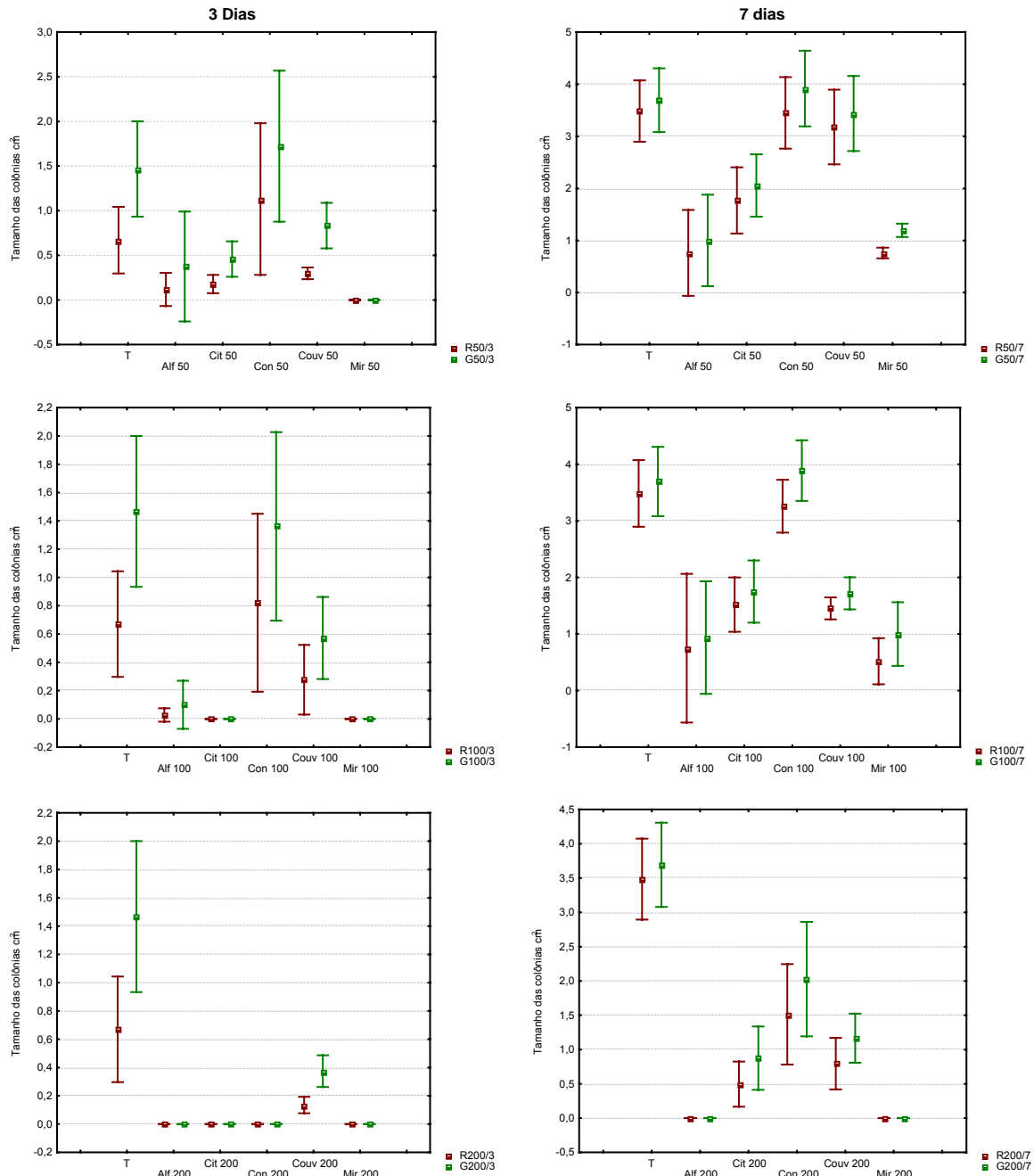


Figura 3.1 Comparação dos resultados obtidos com a régua e com a grade, nos diferentes tratamentos aos 3 e 7 dias após a inoculação. R= Régua, G= Grade, T= Controle, Alf= *O. gratissimum*, Cit= *C. winterianus*, Con= *S. officinale*, Couv= *P. ruderale* e Mir= *T. riparia*. Londrina-PR, 2008.

Devido à praticidade para obtenção dos dados e a confiabilidade dos mesmos, empregou-se como padrão para a discussão dos resultados os valores obtidos pelo princípio morfométrico de contagem dos pontos (grade), figura 3.2.

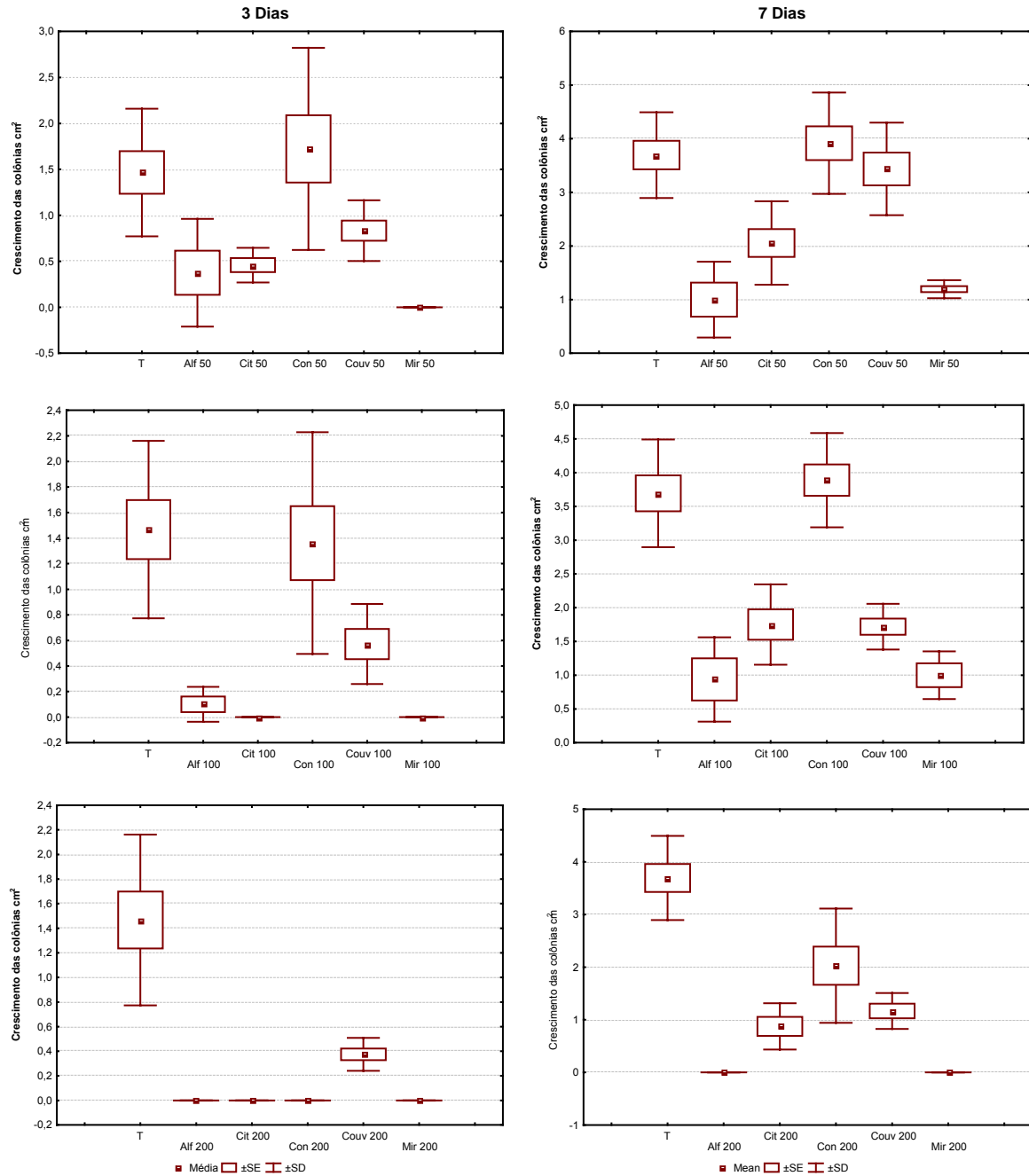


Figura 3.2 Crescimento das colônias de *T. rubrum* medidos com grade, nos diferentes tratamentos aos 3 e 7 dias após a inoculação. T= Controle, Alf= *O. gratissimum*, Cit= *C. winterianus*, Con= *S. officinale*, Couv= *P. ruderale* e Mir= *T. riparia*. Londrina-PR, 2008.

De acordo com esta proposta de classificação, os extratos que apresentaram resultados positivos para a inibição do desenvolvimento dos inóculos de *T. rubrum* foram *O. gratissimum* e *T. riparia*, pois como pode ser observado na figura 3.2, foram as únicas espécies que conseguiram evitar o desenvolvimento dos inóculos, quando empregadas na maior concentração testada (200µg/mL), passados sete dias da inoculação, demonstrando um potencial fungicida de forte inibição, enquanto as demais espécies testadas apenas proporcionaram uma diminuição do crescimento das colônias, mostrando desta maneira um potencial fungistático, quando comparadas com o desenvolvimento do inóculo no tratamento controle.

As porcentagens de inibição do crescimento dos inóculos de *T. rubrum* variaram tanto entre as concentrações como entre as épocas de avaliação, quando comparadas com o controle (Tabela 3.2). O extrato de *O. gratissimum* variou de 37,3% para 100% de inibição nas concentrações de 50 e 200µg/mL aos três dias após a inoculação, e de 73% para 100% nas mesmas concentrações aos sete dias após a inoculação. Já o extato de *T. riparia* apresentou 100% de inibição aos três dias e variou de 67,8% para 100% nas mesmas concentrações, aos sete dias após a inoculação.

Estes resultados demonstraram que extratos aquosos de diferentes plantas variam significativamente quanto ao seu potencial antifúngico. Estas diferenças podem ser atribuídas a diferenças na natureza e ou concentração de inibidores em diferentes espécies de plantas e na sua solubilidade relativa em água (QUASEM; ABU-BLAN, 1995).

Silva et al (2005), estudando a atividade antifúngica de *O. gratissimum* contra dermatófitos, entre eles, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, relataram que 100% dos dermatófitos foram inibidos pelo extrato desta planta extraído com o solvente hexano, na concentração de 125µg/ml, pelo óleo essencial em 250µg/ml e pelo extrato obtido com clorofórmio em 500µg/ml. Estes autores também observaram que o eugenol, o maior constituinte do óleo essencial de *O. gratissimum*, inibiu o crescimento de 80% dos inóculos testados, na concentração de 125µg/ml, enquanto 60% destes inóculos foram inibidos pelo fungicida sintético itraconazol, na mesma concentração. Estes resultados demonstram a alta atividade antifúngica dos extratos desta planta.

Nas pesquisas realizadas com óleos essenciais das espécies *O. gratissimum* e *T. riparia* foram observadas atividades repelentes contra insetos.

Ogendo et al. (2008), evidenciaram a ação do óleo de *O. gratissimum* em repelir pragas de grãos armazenados, e uma pesquisa realizada por Omolo et al. (2004), mostra que frações do óleo de *T. riparia* são eficazes na repelência do mosquito *Anopheles gambiae*, um possível vetor da malária.

Óleos essenciais de canela chinesa, *Cinnamomum cassia*, assim como a substância cinnamaldeído, isolada desta espécie, mostraram resultados similares ao do fármaco griseofulvin, inibindo o desenvolvimento de colônias de *T. rubrum* em dosagens entre 18,8 e 31,2 µg/ml (OOI et al, 2006).

Os extratos aquosos da espécie *C. winterianus* apresentaram um bom resultado de inibição dos inóculos aos três dias após a inoculação, sendo as inibições proporcionais a 69,3%, 100% e 100% para as concentrações de 50, 100 e 200µg/mL, respectivamente, entretanto estas porcentagens caíram para 44,3%, 52,7% e 76,2% aos sete dias após a inoculação, para as mesmas concentrações. O mesmo ocorreu com os extratos de *P. ruderale* aos três dias após a inoculação na concentração de 200µg/ml inibindo 100% dos inóculos, porém aos sete dias após a inoculação apresentou uma inibição de 68,4%.

Diferindo dos extratos anteriormente citados, *S. officinale* demonstrou inicialmente, na menor concentração (50µg/ml), valores de desenvolvimento das colônias superiores aos do tratamento controle, tanto aos três quanto aos sete dias após a inoculação (figura 3.2). O seu potencial inibitório pode ser observado na maior concentração (200µg/ml), onde aos três dias após a inoculação houve inibição de 100% do inóculo, porém aos sete dias esta porcentagem caiu significativamente para 45,1%. Estes dados revelaram que os extratos aquosos das espécies *S. officinale*, *P. ruderale* e *C. winterianus* não possuem propriedades fungicidas, mas sim fungistáticas, sobre inóculos de *T. rubrum*, nas concentrações testadas nesta pesquisa.

Outras substâncias, testadas *in vivo*, também demonstraram efeitos positivos na inibição do desenvolvimento das colônias e da esporulação de fungos dermatófitos, incluindo o *T. rubrum*. Sokovic et al. (2006) raspam áreas definidas nas costas de ratos Winstar e inocularam fungos dermatófitos. Após a infecção dos fungos ser evidente, iniciaram tratamento com óleo essencial de *Mentha piperita* 1% (v/v) em vaselina de petróleo, aplicada de forma tópica diariamente sobre as lesões induzidas, e verificaram que após trinta dias de tratamento os ratos não apresentavam mais sinais de infecção fúngica. Etuk et al. (2008) também relataram a

inibição da produção de esporos fúngicos em lesões induzidas nas costas de ratos, com a utilização de extratos aquosos de *Pterocarpus erinaceus* na concentração de 40mg/mL.

Além de extratos de plantas e óleos essenciais vegetais, outros organismos também já foram testados na busca por propriedades inibidoras do crescimento e desenvolvimento de dermatófitos. Testando extratos aquosos e metanólicos de *Holoturia polii*, uma espécie de pepino do mar, Ismail et al. (2008) não conseguiram inibir o desenvolvimento de inóculos de *T. rubrum in vitro*. Entretanto, nas pesquisas realizadas com a alga vermelha, *Odonthalia corymbifera*, Oh et al. (2008), utilizando bromofenóis isolados do extrato da alga, determinaram *in vitro* a inibição do desenvolvimento de inóculos de *T. rubrum* com concentrações de apenas 1,56µg/mL.

A utilização de recursos tecnológicos, como por exemplo o microscópio eletrônico de varredura (MEV), são ferramentas que podem auxiliar na compreensão dos efeitos desencadeados pelos extratos vegetais aquosos sobre os inóculos de *T. rubrum* utilizados na pesquisa. Os extratos que demonstraram potencial de inibição ao desenvolvimento dos inóculos testados foram submetidos ao MEV para a observação de efeitos desencadeados pelos extratos nos inóculos.

Observaram-se diferenças morfológicas e de formação de microconídios das colônias de *T. rubrum* no tratamento controle (figura 3.3 a) e no tratamento com o extrato de *T. riparia* (figura 3.3 b) na concentração de 100µg/mL aos 7 dias após a inoculação.

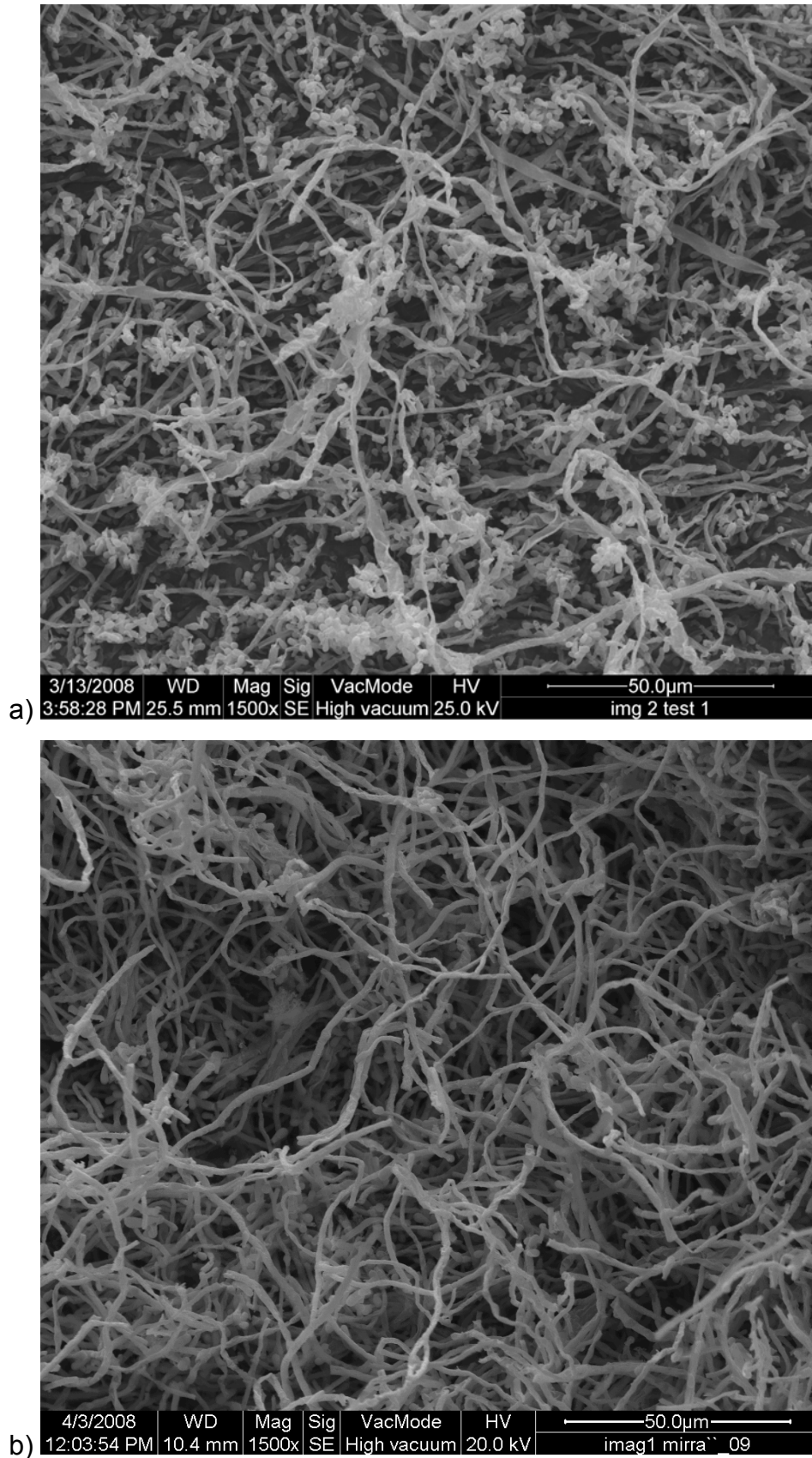


Figura 3.3 Eletromicroscopia de varredura do tratamento controle (a) e do extrato de *T. riparia* na concentração de 100µg/mL (b) aos 7 dias após a inoculação. Londrina-PR, 2008.

A microscopia eletrônica de varredura oferece uma contribuição valiosa para a investigação biológica, cobrindo um intervalo de informações que se situam entre a microscopia de luz e a microscopia de transmissão. As aplicações da microscopia eletrônica de varredura incluem desde o estudo de objetos macroscópicos (organismos inteiros, partes de vegetais, órgãos isolados, células em cultura) até o estudo de macromoléculas orgânicas, bactérias, frações celulares, entre outras coisas (SOUZA, 2007).

O MEV produz uma imagem da superfície da amostra com uma profundidade de foco aproximadamente 500 vezes maior que o microscópio óptico. Esta grande profundidade de foco produz uma imagem onde toda, ou a maioria, da amostra está em foco, proporcionando desta maneira uma imagem com uma grande profundidade tridimensional (LEE, 1993).

Observando as diferenças quanto ao desenvolvimento do micélio e a produção de microconídios entre o tratamento controle e o tratamento realizado com o extrato aquoso de *T. riparia* demonstrados na figura 3.3, notam-se claramente sinais do potencial inibitório deste extrato vegetal sobre o desenvolvimento do inóculo do fungo dermatófito *T. rubrum*.

Depois de se conhecer o potencial antimicótico de algumas substâncias presentes em diversos organismos, deve-se dar continuidade a programas de desenvolvimento de medicamentos, que a médio/longo prazo, poderão contribuir para aumentar o número de antimicóticos disponíveis no mercado (ARANGO; SANCHÉS; GALVIS, 2004).

3.5 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que algumas das plantas testadas são importantes produtoras de compostos antifúngicos, podendo ser fontes renováveis e úteis de antimicóticos contra infecções dermatofíticas em seres humanos e animais. Entre as espécies testadas destacaram-se os extratos aquosos de *O. gratissimum* e de *T. riparia* na concentração de 200µg/mL, devido a sua capacidade fungicida, frente ao inóculo do fungo dermatófito *T. rubrum* utilizado nas pesquisas.

Os extratos aquosos de *C. winterianus*, *P. ruderale* e *S. officinale* demonstraram efeitos fungistáticos, nas concentrações testadas neste estudo, não inibiram totalmente o desenvolvimento do inóculo de *T. rubrum*.

Entre as técnicas utilizadas para a avaliação do crescimento das colônias fungicas, o método morfométrico da contagem de pontos, utilizando uma grade quadriculada demonstrou ser mais eficiente, preciso e rápido que o método de medida do diâmetro, com o uso de régua.

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é uma ferramenta muito útil cuja aplicação permite verificar os efeitos dos extratos vegetais sobre o crescimento de fungos dermatófitos.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Produtos de origem natural, como os extratos vegetais testados neste experimento podem conter substâncias úteis para o desenvolvimento de fármacos que visem combater o desenvolvimento de fungos dermatófitos.

Sendo uma fonte natural e renovável, plantas com propriedades medicinais tem grandes chances de tornarem-se alternativas mais baratas e com menores efeitos adversos aos pacientes afligidos por diversas patologias.

Novos estudos devem ser conduzidos com as plantas que demonstraram potenciais antifúngicos, visando observar-se a toxicidade destas substâncias para as células humanas e também quais frações ou compostos presentes nestes vegetais possuem tal atividade.

REFERÊNCIAS

- ABLORDEPPEY, S.; FAN, P.; ABLORDEPPEY, J.H.; MARDENBOROUGH, L. Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: current status and emerging drugs in development. **Current Medicinal Chemistry**, v.6, n.11, p.1151-1195, 1999.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, M.M.B.; LOPES, M.F.G.; NOGUEIRA, C.M.D.; MAGALHÃES, C.E.C.; MORAIS, N.M.T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.94-97, 2002.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A; HIGINO, J.S.; SILVA, L.R.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v.15, n.1-3, p.66-69, 2003.
- ARANGO, A.C.M.; SÁNCHEZ, J.G.B.; GALVIS, L.A.B. Productos naturales con actividad antimicótica. **Revista Española de Quimioterapia**, v.17, n.4, p.325-331, 2004.
- BAHMER, F.A.; LORENZ, E. Evaluation of the growth dynamics of *Trichophyton rubrum* cultures by morphometry and non-linear curve fitting analysis. **Mycoses**, v.43, n.1-2, p.25-28, 2000.
- BASILE, A.; GIORDANO, S.; LOPEZ-SAEZ J.A.; COBIANCHI, C.R. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v.52, n.8, p.1479-82, 1999.
- BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; MONTESANO, D.; COBIANCHI, C.R.; VUOTTO, M.L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v.71, suppl.1, p.110-116, 2000.

BIAVATTI, M.W. Química e bioatividade da *Raulinoa echinata*, espécie endêmica do Vale do Itajaí - SC. 2001. 248p. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BLACK, J.G. **Microbiology**: Principles & Applications. 3 ed. New Jersey: Simon & Scuster, 1996.

BLOCK, L.C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N.L.M.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paudosa* D.C. (Compositae). **Pharmazie**, v.53, n.10, p.716-718, 1998.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, n.1, p.53-67, 1993.

BROOKS, G.R.; BUTEL, J.S.; MORSE, A.S. **Microbiologia Médica**. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 524p.

CALIXTO, J.B; BEIRITH, A.; FERREIRA, J. SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, n.6, p.401-418, 2000.

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

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v.23, n.5, p.680-685, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica, obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.47-75, 2001.

CHAN, M.M.Y. Anti microbial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v.63, n.2, p.99-104, 2002.

CLARKE, J.M.; GILLINGS, M.R.; ALTAVILLA, N.; BEALE, A.J. Testing natural products for antimicrobial activity - potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability. **Journal of Microbiological Methods**, v.46, n.3, p.261, 2001.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Etnofarmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.135-143, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CVETNIC, Z.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. **Acta Pharmaceutica**, v.54, n.3, p.243-250, 2004.

DAS DORES, R.G.R.; VIANA, L.O.; PEREIRA, L.E.; PEDROSA, C.D.; SILVA, R.R.; PINHEIRO, A.C.N.; NASCIMENTO, C.B.; SILVA, D.C.O.; CAMPOS, G.B.W.; BORGES, J.; ALMEIDA, J.C.S.; FREITAS, L.S.; SILVA, L.C.; FONTES, S.D.; PEREIRA, T.M.C.; MIRANDA, T.M. Fitoterapia e alopatia: a atenção farmacêutica "verde". **Infarma**, v.15, n.3, p.62-65, 2003.

DE BOER, H.J.; KOOL, A.; BROBERG, A.; MZIRA Y.W.R.; HEDBERG, I.; LEVENFORS, J.J. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.461-469, 2005.

DE SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. (Editores) **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Editora UNIVALI, Itajaí, 2003.

DIDOMENICO, B. Novel antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, n.5, p.509-515, 1999.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of brasilian medicinal planta. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.305-311, 2005.

ETUK, E.U.; SUBERU, H.A.; AMEH, I.G.; ABUBAKAR, K. Antimicotic effect of aqueous leaf extract of *Pterocarpus erinaceus* in rats. **Journal of Pharmacology and toxicology**, v.3, n.4, p.318-323, 2008.

FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSROG, R. Fungistatic and fungicidal activity of East African medicinal plants. **Mycoses**, v.39, n.1-2, p.67-70, 1996.

FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES FILHO, S.L.M.; QUEIROZ, S.R.R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**, Academia Brasileira de Ciências, São Paulo, 1998. 133p.

FETROW, C.W.; ÁVILA, J.R. **Manual de Medicina Alternativa para o Profissional**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1999. 743p.

FISHER, F.; COOK, N.B. **Micologia: Fundamentos e Diagnóstico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 337p.

FONSECA, A.L. **Antibióticos na Clínica Diária**. 6 ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. 468p.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v.48, n.4, p.306-310, 1995.

GALGIANI, J. Antifungal susceptibility tests. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, n.12, p.1867-1870, 1987.

GHASEMI, Y; YASDI, M.T.; SHAFIEE, A.; AMINI, M.; SHOKRAVI, S.; ZARRINI, G. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.4-5, p.318-322, 2004.

GIORDANI, R.; GACHON, C.; BUC, J.; REGLI, P.; JACOB, J L. Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex, its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth. **Mycoses**, v.42, n.7-8, p.465-474, 1999.

GNANAMANICKAM, S.S.; MANSFIELD, J.W. Selective toxicity of wryone and other phytoalexins to Gram positive bacteria. **Phytochemistry**, v.20, n.5, p.997-100, 1981.

GUNDERSEN, H.J.G.; JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v.147, n.2, p.229-263, 1987.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. **Agriculture Biological Chemistry**, v.47, n.9, p.2061-2069, 1983.

GURGEL, A.L.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T.; CECHINEL FIHO, V.; RAO, V.S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.409-412, 2005.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, compatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v.11, n.3, p.137-147, 2000.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HARBONE, J.B. Role of Secondary Metabolites in Chemical Defence Mechanism in Plants. Bioactive compounds from Plants. **Ciba Foundation Symposium 154**. Wiley, Chichester, p.126-139, 1990.

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.

IROBI, O.N.; DARAMOLA, S.O. Antifungal activities of crude extrats of *Mitracarpus villosus* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, n.2, p.137-140, 1993.

ISMAIL, H; LEMRISS, S.; BEN AOUN, Z.; MHADHEBI, L.; DELLAI, A.; KACEM, Y.; BOIRON, P.; BOURAOUI, A. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, n.1, p.23-26, 2008.

JOYCE, C. **Earthly goods**: medicine hunting in the rainforest. New York. Ed. Little, Brown and Company.1994. 304p.

KÖLER, T.; PECHÉRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.56, n.9-10, p.771-778, 1999.

KUMAR, P. Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. **Current Science**, v.86, n.7, p.930-937, 2004.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI. E.M.; MELO, N.T. **Guia para Identificação** - Fungos, Actinomicetos, Algas de Interesse Médico, Sarvier: São Paulo, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI. E.M.; DE MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, Sarvier: São Paulo, 2002. 1104p.

LEE, E.W.; CHEN, J.; HUDA, M.N.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA.T. Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.2, p.266-270, 2003.

LEE, K.W.; EVERTS,H.; BEYNEN, A.C. Essential oils in broiler nutrition. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.12, p.738-752, 2004.

LEE, R.E. **Scanning Eletron Microscopy and X-Ray Microanalysis**. PTR Prentice Hall, New Jersey, 1993.

LIMA, E.O. Estudo das dermatofitoses em João Pessoa - Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados. São Paulo, 1996. 180p. **Tese** (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos: Chapecó, p.479-499, 2001.

LÓPEZ, S.N.; CASTELLI, M.V.; ZACCHINO, S.A.; DOMINGUEZ, G.L.; CHARRIS-CHARRIS, I.; CORTÉS, I.C.G.; RIBAS. I.C.; DEVIA. C.; RODRIGUEZ, A.M.; ENRIZ, R.D. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.9, n.8, p.1999-2013, 2001.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAGISTRETTI, M.J. Remark on the pharmacological examination of plant extracts. **Fitoterapia**, v.25, n.1, p.67-79, 1980.

MARCHISIO, F.V.; PREVE, L.; TULLIO, V. Fungi responsible for skin mycoses in Turin (Italy). **Mycoses**, v. 39, n.3-4, p.141-150, 1996.

MAZÓN, A.; SALVO, S.; VIVES, R. VALCAYO, A.; SABALZA, M.A. Estudio etiológico y epidemiológico de las dermatofitosis en Navarra (España). **Revista Iberoamericana de Micología**, v.14, p.65-68, 1997.

MENDELSON, R., BALICK, M. The value of undiscovered pharmaceutical in tropical forest. **Economic Botany**, v.49, n.3, p.223-228, 1995.

MEYERS, J.D. Fungal infections in bone marrow transplant patients. **Seminars in Oncology**, v.17, p.424-436, 1990.

MEZZARY, A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.40, n.2, p.71-76, 1998.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**, 2.ed. Manole: São Paulo, 1999. 584p.

MITSCHER, L.A.; LEV, L. P.; BATTIOLA, M.S.; WU, W.N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v.35, p.157-166, 1972.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 761p.

NADINIC, E.L.; PENNA, C.; SAAVEDRA, C.L.; COUSSIO, J.D.; GUTKIND, G.; DEBENEDETTI, S.L. Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.2, p.123-130, 2002.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.247-256, 2000.

NEW ALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J D. **Herbal medicines: a guide for healthcare professionals**. London: Pharmaceutical Press, 1996. 296p.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Editora UNIVALI, 2003. p.10-56

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2003. 467p.

OGENDO, J.O.; KOSTYUKOVSKY, M.; RAVID, U.; MATASYOH, J.C.; DENG, A.L.; OMOLO, E.O.; KARIUKI, S.T.; SHAYYA, E. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. **Journal of Stored Products Research**, (in press), 2008.

OH, K.; LEE, J.H.; CHUNG, S.; SHIN, J.; SHIN, H.J.; KIM, H.; LEE, H. Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.1, p.104-108, 2008.

OMOLO, M.O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I.O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**, v.65, n.20, p.2797-2802, 2004.

OOI, L.S.M.; LI, Y.; KAM, S-L.; WANG, H; WONG, E.Y.L.; OOI, V.E.C. Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.34, n.3, p.511-522, 2006.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated *Plumbago* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.959-961, 2003.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-328, 2004.

PHILLIPS, P.; STEVENS, D.A.; VIVIANI, M. Managing Fungal Infection in the 21st century: Focus on itraconazole. In: STEVENS, D.A. **Drugs Supplement**, v.61, n.1, p.203-219, 2001.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n.3, p.237-243, 2001.

QUASEN, J.R.; ABU-BLAN, H.A. Antifungal activity of aqueous extracts from some weed species. **Annals of Applied Biology**, v.127, n.3, p.215-219, 1995.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v.2, n.5, p.199-203, 1991.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; HOSTETTMANN, K. Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, v.60, n.1, p.41-43, 1994.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**, 2 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1993. 595p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 3.ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997. 692p.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, n.3, p.275-283, 1992.

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNÁNDEZ, I.; ALBÁN, J.; LOCK, O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.199-204, 2003.

RON, B. H.; WILLS, K. B.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition Research Reviews**, v.13, n.1, p.47-77, 2000.

RUBIO, M.C.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J.G.; RUESCA, R.B. Perspectiva micológica de los dermatófitos en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.16, p.16-22, 1999.

SAMPAIO, S.A.P. **Dermatologia Básica**. Artes Médicas: São Paulo, 1997. 370p.

SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; BELLA CRUZ, A.; BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*)(Asteraceae). **Pharmazie**, v.58, n.8, p.567-569, 2003.

SATO, N.T.; TANAKA, H.; FUJIWARA, S.; HIRATA, M.; YAMAGUCHI, R.; ETOH, H.; TOKUDA, C. Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacterial. **Phytomedicine**, v.10, n.5, p.427-433, 2003.

SAVI, A.O.; BREVIGLIERI, E.; BELLA CRUZ, A.; YUNES, R.; CECHINEL FILHO, V. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Revista de Biologia Tropical**, v.44/45, n.1, p.601-603, 1997.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**, 3 ed. Guanabara Koogan:Rio de Janeiro, 2002. 664p.

SCHLEMPER, S.R.M.; CORDEIRO, F.; BLOCK, L.C.; CECHINEL FILHO, V. Atividade antibacteriana de frações semipurificadas e compostos puros de *Wedelia paludosa* (Compositae). **Alcance** (Itajaí), v.5, n.2, p.14-18, 1998.

SCHLEMPER, S.R.; SCHLEMPER, V.; SILVA, D.; CORDEIRO, F.; BELLA CRUZ, A.; OLIVEIRA, A.E.; CECHINEL FILHO, V. Antibacterial activity of *Persea cordata* steam barks. **Fitoterapia**, v.72, n.1, p.73-75, 2001.

SELINTRENNIKOFF, C. Screening for antifungal drugs. In: FINKEELSTEIN, D.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi** - Technology and Products. Butterworth Heinemann, Boston. p. 189-217,1992.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p.2883-2894, 2001.

SIANI, CARLOS. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos**: plataforma metodológica. Scriptorio:Rio de Janeiro, 2003. 99p.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da micologia Médica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999. 287p.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 408p.

SILVA, M.M.; SANTOS M.R.; CAROCO, G.; ROCHA R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v.36, n.11 p.1219-1227, 2002.

SILVA, R.R, OLIVEIRA Jr., J.G.; FERNANDES, O.F.L.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, J.A.; PAULA, J.R. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. **Mycoses**, v.48, n.3, p.172-175, 2005.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2003. 467p.

SIVROUPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.9, p.2384-2388, 1995.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v.15, n.3, p.70-73, 2002.

SOKOVIC, M.D.; GLAMOCLIJA, J.; MARIN, P.D.; BRKIC, D.D.; VUKOJEVIC, J.; JOVANOVIC, D.; BULAJIC, N.; KATARANOVSKI, D. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Mentha x piperita*. **Pharmaceutical Biology**, v.44, n.7, p.511-515, 2006.

SOLÍS, C.; BECERRA, J.; FLORES, C.; ROBLEDO, J.; SILVA, M. Antibacterial and antifungal terpenes from *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.49, n.2, p.157-161, 2004.

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KRUEGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Ed. Univali, 2003. 239p.

SOUZA, W. (Ed.). **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007. 357p.

TADEG, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAM, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.168-175, 2005.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**, 3 ed. Atheneu: São Paulo, 2001. 150p.

TERRAGNI, L.; LASAGNI, A.; ORIANI, A. Dermatophytes and dermatophytoses in the Milan area between 1970 and 1989. **Mycoses**, v.36, n.7-8, p.313-317, 1993.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds). **Microbiologia**, 5.ed. Atheneu: São Paulo, 2008. 780p.

TSHIKALANGE, T.E.; MEYER, J.J.M.; HUSSEIN, A.A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.515-519, 2005.

TYLER, V.E. Phytomedicines: back to the future. **Journal of Natural Products**, v.62, n.11, p.1589-1592, 1999.

UGAZ, O.L. **Investigación Fitoquímica**, 2 ed. Lima: Pontificia Universidad del Peru: Fondo editorial, 1994. 300p.

URBINA, J.M.; CORTES, J.C.G.; PALMA, A.; LÓPEZ, S.N.; ZACCHINO, S.A.; ENRIZ, R.D.; RIBAS, J.C.; KOUZNETSOV, V.V. Inhibitors of the fungal cell wall: Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamino-1-butenes and related compounds with inhibitory activities of (1-3) β glucan and chitin synthases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, n.4, p.691-698, 2000.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157: H7. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.49-54, 2004.

WEIBEL, E. R. **Practical Methods for Biological Morphometry**. London: Academic Press, 1979. 415p.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.2, p.240-259, 1995.

WHITE, T.; MARR, K.; BOWDEN, R. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistense. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p.382-402, 1998.

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

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v.66, n.4, p.921-924, 2002.

YOUNG, J.M.; NAQVI, M.; RICHARDS, L. Microbial contamination of hospital bed handsets. **American Journal of Infection Control**, v.33, n.3, p.170-174, 2005.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001, 500p.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

ZACCHINO, S.; SANTECCHIA, C.; LÓPEZ, S.; GATTUSO, S.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, A.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; SALINAS, A.; RUIZ, R.E.; RUIZ, S. In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. **Phytomedicine**, v.5, n.5, p.389-395, 1998.

ZACCHINO, S.A.; LOPEZ, S.N.; PEZZENATI, G.D.; FURLÁN, R.L.; SANTECCHIA, C.B.; MUÑOZ, L.; GIANNINI, F.A.; RODRIGUEZ, A.M.; ENRIZ, R.D. *In vitro* evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids and related compounds acting against dermatophytes. **Journal of Natural Products**, v.62, n.10, p.1353-1357, 1999.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.47-75, 2001.

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the Inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. (Editors) **Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects**. The Haworth Press, p.1-41, 2003.

ZAITS. C.; CAMPBELL. L; MARQUES. S.A.; RUIZ. L.R.B.; SOUZA. V.M.
Compendio de Micologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda. 1998. 434p.