



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SIMONE ROCHTASCHEL FOSS

**ATIVIDADE ANTIDERMATÓFITO DE PRODUTOS
OBTIDOS DE *Punica granatum***

SIMONE ROCHTASCHEL FOSS

**ATIVIDADE ANTIDERMATÓFITO DE PRODUTOS
OBTIDOS DE *Punica granatum***

Exame de defesa como exigência para obtenção do Título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da pós-graduanda *Simone Rochtaschel Foss* sob a orientação do Professor Dr. *Benedito Prado Dias Filho*.

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F751a Foss, Simone Rochtaschel
Atividade antidermatófito de produtos obtidos de *Punica granatum* / Simone
Rochtaschel Foss. -- Londrina, 2010.
43 f. : il. color., tabs.

Orientador: Prof^o Dr^o Benedito Prado Dias Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia.

1. *Punica granatum* – Propriedades farmacêuticas. 2. Romã – Medicina
tradicional - Estudo. 3. Punicalagina - Extrato. 4. Dermatófitos – Micoses -
Tratamento. 5. Micoses - *Trichophyton rubrum*. I. Dias Filho, Benedito Prado,
orient. II. Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia. III. TÍTULO.

CDD 21. ed. 616.015

SIMONE ROCHTASCHEL FOSS

ATIVIDADE ANTIDERMATÓFITO DE PRODUTOS OBTIDOS DE
Punica granatum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez
UEM – Maringá - PR

Profa. Dra. Sueli Fumie Ogatta
UEL – Londrina - PR

Londrina, ____ de _____ de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho, por me orientar por todos estes anos, desde o primeiro ano de iniciação científica.

Em segundo lugar, agradeço aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, Fundação Araucária e FINEP. Também agradeço profundamente aos professores Celso Vataru Nakamura, Tânia Ueda Nakamura e Diógenes Aparício Garcia Cortez pelos conhecimentos compartilhados, contribuindo significativamente para minha formação.

À técnica Marinete Martinez, pelo competente apoio técnico e terna amizade.

Aos meus irmãos, Eduardo e Viviane, e meu pai, Geromildo pelo imenso carinho. À minha mãe, Ivete, por ser a maior incentivadora dos meus projetos de vida.

Ao meu namorado, Rafael Zulin, pelo apoio e dedicação.

E claro, aos meus queridos amigos, agradeço por suportarem comigo as e dificuldades e por comemorarem as alegrias que este trabalho me proporcionou. São muitos, mas dedico especial atenção: Ilan Ayer, Juliana Bossoni Máximo, Cynara Romero, Lara Isys Dias, Luciana Hino.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, agradeço por tornarem o estressante trabalho diário em momentos de satisfação, e agradeço especialmente: Helena Takahashi, Erika Izumi, Rodrigo Valdez, Andrea Koroish, Eliana Endo, Raíssa Pedroso Bochi, Milene Lopes, Karin Juliane Pelizzaro Rocha, Karine Zanoli, Kaline Cristiane Pelizzaro Rocha, Marco Antonio Costa e Gislaine Costa, Patrícia Santos, Jackeline Guinoza, e Cleyton Toledo.

“O primeiro pecado da humanidade foi a fé. A primeira virtude, a dúvida.”

Carl Sagan

FOSS, Simone Rochtaschel. **Atividade antidermatófito de produtos obtidos de *Punica granatum***. 2010. 43 f Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A romã é utilizada na medicina tradicional de diversas regiões do mundo e vem sendo estudada, tendo diversas propriedades farmacêuticas. O tratamento de micoses cutâneas são difíceis devido às características de latência dos conídeos, à seleção de resistentes, longo tempo de uso e alto custo dos medicamentos. Nós verificamos a atividade de extrato hidroalcoólico de pericarpo de *Punica granatum* contra os fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *M. gypseum* com CIM de 125, 125, 250, 250 µg/ml, respectivamente. A partir do teste inicial, foi isolada a substância ativa Punicalagina, a qual teve CIM igual ao do extrato bruto. A espécie *T. rubrum* foi utilizada como modelo para os testes posteriores. O extrato bruto parece agir sobre a germinação dos conídeos (62,5 µg/ml) e sobre a elongação das hifas (62,5 µg/ml). Determinamos que extrato bruto não atua na ligação ao ergosterol de membrana, determinado pelo ensaio com ergosterol. Também não atua alterando a composição de quitina da parede celular, não sendo observadas alteração morfológica. A citotoxicidade mostrou que o extrato bruto é cerca de 3 vezes mais seletivo ao fungo que às células de mamíferos. Estes dados indicam a possível utilização do extrato de romã para a formulação de novo medicamento antidermatófito.

Palavras-chaves: *Punica granatum*. Romã. Punicalagina. Dermatófitos. *Trichophyton rubrum*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	DERMATÓFITOS E DERMATOFITOSSES	11
3.2	PLANTAS MEDICINAIS.....	15
3.3	PUNICA GRANATUM.....	18
	REFERÊNCIAS	22
4	ARTIGO	28
	REFERENCES	41

1 INTRODUÇÃO

Os fungos dermatófitos são capazes de infectar a pele e seus anexos como unhas e pêlos; não estão presentes na microbiota normal humana, porém, diferentemente de outros fungos podem utilizar a queratina como fonte de nutrientes. (OGAWA et al., 1998 *in* BAEZA, 2007). Três principais gêneros de fungos estão envolvidos na infecção destes tecidos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (LACAZ et al., 1984). Em geral estes microrganismos não representam risco de morte, entretanto, seu estudo é de grande importância, uma vez que afetam a qualidade de vida dos pacientes (JOHNSON, 2003). Podemos citar como exemplo as infecções de unhas, as onicomicoses, que muitas vezes são crônicas e comprometem a estética, conseqüentemente a auto-estima, bem como a qualidade de vida, podendo ainda ser um agente disseminador de propágulos fúngicos.

As manifestações clínicas na pele variam desde descamação epitelial, vesículas e eritemas, concomitantemente com a ocorrência de coceiras e ardor. Em raras ocasiões, podem provocar lesões nas camadas mais profundas a nível dérmico e hipodérmico. Nas infecções de unhas, estas se tornam friáveis e corroídas (LACAZ et al., 1984). A infecção do tecido epitelial por fungos dermatófitos podem ainda tornar o tecido suscetível às infecções bacterianas, agravando o quadro clínico.

Os tratamentos antifúngicos podem ser de administração tópica, sistêmica ou a combinação de ambas. Em geral, os antifúngicos para terapia tópica são os de amplo espectro. Apesar da existência de diferentes classes de antifúngicos, é sabida a ocorrência de seleção de organismos resistentes. Ademais, os antifúngicos disponíveis apresentam desvantagens como tempo de tratamento prolongado, alto custo e efeitos adversos.

Devido a estes fatores, é necessária a busca de novas moléculas com atividade contra os fungos dermatófitos. Neste sentido, as plantas são fontes de diferentes classes de moléculas com potencial ação antimicrobiana. De acordo com a Organização Mundial de Saúde OMS, cerca de 60-85% da população mundial não tem acesso ao tratamento primário de saúde recorrendo à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, em busca de alívio às enfermidades (CALIXTO, 2001). Entretanto, muitas destas plantas não foram submetidas a estudos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos, ameaçando a segurança e eficácia de seu uso. Desta maneira, estas plantas são um evidente objeto de estudo para a obtenção de moléculas ativas.

A romãzeira e seus frutos são mundialmente utilizados como agente adstringente e para tratamento contra úlceras, danos hepáticos, doenças do coração, inflamação de garganta e estomatites (AJAIKUMAR et al., 2005). Vários aspectos da utilização popular desta planta tem sido objeto de estudo dos pesquisadores, sendo descritas na literatura a atividade contra uma variedade de microrganismos, dentre eles fungos e bactérias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração ativa, citotoxicidade e o modo de ação de extrato hidroalcoólico de pericarpo de *Punica granatum* contra dermatófitos, além do isolamento e identificação da substância ativa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de extrato hidroalcoólico de pericarpo de *Punica granatum*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato contra bactérias e fungos dermatófitos;
- Isolar e identificar a molécula ativa;
- Avaliar a ação do extrato, frações e substância isolada em estruturas fúngicas como hifas e conídeos;
- Determinar a integridade da parede celular da hifa quando em contato com a substância ativa, por meio do ensaio de fluorescência.
- Realizar o ensaio do ergosterol a fim de verificar se o mecanismo de ação da substância isolada está envolvido na via do ergosterol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DERMATÓFITOS E DERMATOFITOSE

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que, em vida parasitária, tem a capacidade de invadir tecidos queratinizados de humanos e outros animais, causando infecções denominadas dermatofitoses.

Os fungos pertencem a um grupo monofilético inserido no domínio *Eukaria* (classificação de Carl Woese). Os Filos são organizados de acordo com características morfológicas do corpo de frutificação, além de presença e tipo de septo entre as células que formam as hifas. O Filo Ascomycota, que apresenta corpo de frutificação em forma de asco, compreende quase 50% de todas as espécies do Reino Fungi e aproximadamente 80% das espécies patogênicas e oportunistas. Os dermatófitos estão taxonomicamente alocados no Filo Ascomycota, Classe Plectomyces, Ordem Onygenales e família Anthodermataceae. (GUARRO et al., 1999). Compreendem três principais gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporium* e *Trichophyton* (LACAZ et al., 1984).

Este grupo de fungos altamente especializados desenvolveu a capacidade de invadir e colonizar os tecidos queratinizados animais por um longo processo evolutivo. Inicialmente, estes fungos eram apenas saprófitas com habilidade em degradar os debrís de queratina do solo. Algumas espécies adquiriram a capacidade de infectar os tecidos de animais vivos que se locomovem rente ao chão. O contato do homem com os animais infectados levou, por meio da pressão seletiva, à adaptação destes fungos à infecção de tecidos humanos (ALY, 1994).

Uma forma de classificar os dermatófitos é agrupá-los de acordo com seu habitat e hospedeiros preferenciais. Os geofílicos são aqueles naturais do solo, apresentam variações ecológicas de acordo com as características de umidade e pH, podendo ocasionalmente infectar humanos e outros animais. Os zoofílicos podem acometer espécies de animais específicos ou ser mais gerais afetando várias espécies animais, e por último, os antropofílicos, aqueles que tem mais facilidade para infectar tecidos humanos (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A pele é formada por três camadas de tecidos: Epiderme, derme e hipoderme ou gordura subcutânea. A epiderme apresenta estratos celulares bem definidos, dos quais dois se destacam: a camada germinativa e a camada córnea. A camada germinativa da

epiderme, mais profunda e em contato com a derme, é composta por melanócitos e queratinócitos, os últimos unidos firmemente por desmossomas. A camada córnea, situada na região mais externa da pele, é formada por células epidérmicas (queratinócitos) anucleadas, com membranas celulares espessas e cujo citoplasma corresponde a um sistema bifásico de filamentos de queratina encerrados em uma matriz amorfa contínua (AULTON, 2005). A derme é uma região rica em mucopolissacarídeos e material fibrilar (fibras colágenas, elásticas e reticulares) com nervos, vasos sanguíneos e linfáticos atravessando a matriz e os apêndices da pele. (AULTON, 2005; SAMPAIO; RIVITTI, 2008). O tecido subcutâneo funciona como amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis (AULTON, 2005).

A partir da epiderme originam-se os pêlos, as unhas, as glândulas sebáceas e sudoríparas. Os apêndices epidérmicos são de grande importância no estudo de infecções fúngicas, pois, muitos deles são ricos em queratina, e podem servir de substrato para diferentes espécies de dermatófitos. Por outro lado, a presença de camadas contínuas de células epiteliais intimamente unidas e a queratina impedem a proliferação de microrganismos, quando a pele está intacta (BLANCO; MAZZINI, 1948). Além disso, a pele apresenta um arranjo de microrganismos da microbiota normal, que competem com aqueles patogênicos (MIMS et al., 1993).

As glândulas sudoríparas exercem uma importante função no corpo, pois secretam o suor que mantém a temperatura corporal, elimina toxinas e retira os microrganismos da pele. Os pêlos originam-se de folículos pilosos e são constituídos pela medula (células pouco queratinizadas), córtex (células queratinizadas e compactas) e cutícula (células altamente queratinizadas em escamas), bainhas epiteliais e bainha conjuntiva. As unhas são formadas por células queratinizadas formando lâminas endurecidas, dando assim, proteção aos dedos das mãos e dos pés (BLANCO; MAZZINI, 1948).

Micoses são doenças de pele devido à infecção por fungos. Os tipos de micoses são classificados quanto à profundidade de infecção. As micoses superficiais são aquelas que não ultrapassam o estrato córneo da epiderme, como tinea vesicolor, piedra e tinea nigra. As micoses cutâneas são aquelas que podem acometer todos os estratos da epiderme e seus anexos, sendo as mais comuns tineas capitis, unguinum, barbae, pedis, dentre outras causadas por dermatófitos e também por espécies de leveduras do gênero *Candida*. Os casos de micoses sub-cutâneas que acometem a derme, incluem chromoblastomicose e esporotricoses (SCHWARTZ, 2004).

As dermatofitoses são doenças de pele causadas por dermatófitos e acometem indivíduos de diferentes faixas etárias, trazendo incômodos sintomas como irritação, coceira e ardor, podendo até mesmo formar fissuras nas regiões interdigitais dos pés e das mãos ou queda de cabelo. Os fungos dermatófitos podem provocar lesões superficiais (eritematosas, vesiculosas e descamativas) ou lesões mais profundas (pustulosas ou granulomatosas) com lesões hipodérmicas ou não (LACAZ et al., 1984).

Quanto aos quadros clínicos de dermatofitoses, as infecções podem ser classificadas de acordo com a região do corpo ou anexos acometidos, sendo as mais conhecidas *tinea capitis* (cabelo), *tinea barbae* (da barba), *tinea corporis* (do corpo), *tinea pedis* (dos pés), *tinea manus* (das mãos), *tinea cruris* (região crural) e *tinea unguinum* ou onicomicoses (das unhas) (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

Os dermatófitos geralmente não causam infecções profundas em hospedeiros saudáveis. Entretanto, pode haver acometimento de pessoas imunocomprometidas, tendo sido descritas lesões a nível dérmico em pacientes com AIDS (TSANG; JIMENEZ-LUCHO, 1996) e transplantados renais (SEÇKIN; HABERAL, 2004) podendo resultar em lesões disseminadas e formas fatais (PELEGRINI et al., 2009). É muito comum o acontecimento de lesões crônicas e lesões recorrentes, ambas relacionadas à falha ou à falta de tratamento, sendo as crônicas muito comuns em unhas. As micoses recorrentes estão relacionadas a esporos latentes na região infectada, servindo como reservatório do agente que, quando em condições apropriadas, infectam a pele novamente.

A infecção fúngica na pele inicia-se pela aderência de conídeos, seguida por rápida germinação e penetração das hifas, causando descamação da célula infectada. Os dermatófitos ainda produzem proteinases, incluindo queratinases que facilita a rápida penetração no estrato córneo (JOHNSON, 2003). Uma característica importante dos dermatófitos é a facilidade para utilizar um ou outro tipo de proteína da classe das queratinas como substrato. O gênero *Microsporum* tem predileção por queratina presente na pele e pêlo, *Epidermophyton*, por pêlo e unha, e o *Trichophyton*, tanto por pele como por pêlo e unha (ZAITZ et al., 1998). Em estudo *ex vivo* utilizando pele humana Duek et al. (2004) constataram que o conídeo de *Trichophyton mentagrophytes* é capaz de germinar na pele em 24 horas, com a aderência auxiliada pela produção de material polimérico observável em microscopia eletrônica que une o conídeo ao estrato córneo. Posteriormente os tubos germinativos alongaram por meio de forças mecânicas e atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas, penetrando nas células cornificadas. Foi possível observar que na ausência do soro

humano, o micélio invadiu as camadas mais profundas da epiderme. O mesmo material polimérico unindo o conídio à pele foi observado por meio de microscopia eletrônica por Kaufman et al. (2007), mostrando ainda que a hifa penetra nas camadas mais profundas da pele sem direção específica. Estes mesmos autores isolaram queratinases e elastinases de cultura de *T. mentagrophytes* mostrando a potencialidade de infectar epiderme e derme (KAUFMAN et al., 2007).

De acordo com Rinaldi (2000), os dermatófitos que mais acometem humanos nos Estados Unidos e na Europa compreendem as espécies *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *E. floccosum* e *Microsporum canis*, sendo que, os que apresentam menores incidência de infecção *M. gypseum*, *T. verrucosum*, *T. soudanense*.

Estudo realizado em Goiânia (GO, Brasil) entre os anos de 1993 e 1997, mostrou que as espécies isoladas com mais frequência foram *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Quanto aos casos clínicos, a *tinea pedis* foi a mais frequente, com predominância dos isolados citados anteriormente como agente etiológico (COSTA et al., 1999). A maior frequência de *T. rubrum* também foi constatada em outros estados brasileiros, como Pernambuco (DAMÁZIO et al., 2007) e Rio Grande do Sul (LOPES et al., 1994).

Múltiplos fatores podem afetar a incidência destas infecções fúngicas em uma população. Isto inclui região geográfica e clima, imunocompetência do hospedeiro, patogenicidade do agente infeccioso e a disponibilidade de tratamento médico (FOSTER et al., 2004). Os conídios, em condições apropriadas, como calor e humidade, desenvolvem-se destruindo a barreira natural da pele e favorece a infecção secundária por bactérias oportunistas (MASRI-FRIDLING, 1996). Os cuidados com higiene pessoal podem prevenir a disseminação dos fungos e a aderência de conídios em pessoas saudáveis, uma vez que podem estar presentes em roupas, escovas de cabelo, sapatos, toalhas e piscinas. Estudo realizado em banhos públicos do Japão mostrou que a simples rotina de lavagem dos pés com sabão e secagem com toalha limpa, após o uso das banheiras, diminui a aderência das espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (WATANABE et al., 2000). O espalhamento de propágulos em ambientes domésticos pode levar à infecção familiar (ALY, 1994).

A terapia antifúngica pode ser de administração tópica, sistêmica ou combinada. Os antifúngicos de uso tópico são, em geral, de amplo espectro (ZAITZ et al., 1998). A griseofulvina foi o primeiro agente antifúngico conhecido, com ação restrita a fungos dermatófitos. É indicada em terapias sistêmicas e provavelmente age nos arranjos de microtúbulos nas células fúngicas (ODDS, 2003). Na prática dermatológica, os antifúngicos

indicados para uso tópico são os derivados imidazólicos (isoconazol, tioconazol, econazol, bifonazol), ciclopiroxolamina, terbinafina e amorolfina. Para tratamento sistêmico são indicados derivados imidazólicos (fluconazol ou itraconazol), griseofulvina, ou um derivado de alilamina (terbinafina). (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

Os antifúngicos poliênicos como anfotericina B e nistatina, se ligam ao ergosterol de membrana perturbando a função membranar. O único poliênico de uso sistêmico é a anfotericina B. As alilaminas, por sua vez, atuam em enzima da via biossintética de ergosterol, mais especificamente na esqualeno epoxidase (ODDS et al., 2003).

Nimura et al. (2001) compararam a atividade antifúngica *in vitro* de antimicóticos. Terbinafina e butenafina, o primeiro amplamente utilizado em forma de esmaltes contra micoses de unha, são inibidores da enzima esqualeno epoxidase, com maior atividade fungicida contra espécies de *Trichophyton*, e com menor intensidade, para *C. albicans* e *Malassezia furfur*. Além disso, verificou-se a atividade de cetoconazol e neticonazol, os quais foram fungistáticos para *C. albicans* e *M. furfur* e inativo para *T. rubrum*. Amorolfina teve ação fungicida contra todos os fungos citados.

Indicados em receituários de consultórios e ambulatórios, administrados em hospitais e consumidos livremente sob a forma de automedicação, o uso abusivo de antibióticos tem gerado como consequência os desastres de ordem terapêutica e epidemiológica, pois esta prática vem sendo responsável por modificações significativas no ambiente microbiano, resultando na emergência de microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos. Estes microrganismos tornam-se habilitados em transferir essas resistências para outras espécies. (SALLES; SALLES, 2000). É importante ressaltar que plantas utilizadas na medicina popular com finalidades terapêuticas têm contribuído para a descoberta de novos fármacos que recentemente são utilizados em tratamentos clínicos. Neste contexto, faz-se necessária a ampliação dos estudos com plantas que sejam de uso popular ou não, pesquisando assim, novas moléculas com maior seletividade, baixa toxicidade e alto potencial farmacológico.

3.2 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas com fins medicinais remonta ao início da civilização. A prática milenar de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais em benefício próprio é amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de

recursos terapêuticos (DI STASI, 1995). O uso de espécies vegetais é observado frequentemente, sendo de grande importância para o tratamento primário à saúde em países pobres e em desenvolvimento.

Alguns escritos antigos se referem ao uso de plantas curativas como o egípcio papiro de Erbers, com data de 1500 a.C que mencionava 150 plantas, além de citar referências ainda mais antigas. Na Índia são descritas 700 plantas de uso medicinal no *Susrutasmhita*, escrito por volta de 600 a.C. (MARQUES, 1999).

O estudo de plantas medicinais inicia-se concomitantemente à fundação da química orgânica moderna, entre os séculos XIX e XX. Alguns fármacos descobertos ainda são utilizados na medicina atual, como é o caso da morfina, isolada em 1803, por Setürner, da *Papaver somniferum*, a papoula, planta usada popularmente para acalmar a dor visceral (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Algumas substâncias isoladas de plantas podem apresentar alta toxicidade. Entretanto, sob modificações químicas dos compostos naturais, estes podem ter a toxicidade diminuída e permanecer com a atividade biológica. Um exemplo é a *Salix alba*, cujas cascas foram utilizadas popularmente na Europa, Ásia e África para combater febre e dor. O composto ativo, o glicosídeo do álcool salicílico, foi isolado em 1828 e, desde então, passou por vários processos de síntese e modificações estruturais, sendo então desenvolvido o AAS - ácido acetil salicílico, menos tóxico que os seus precursores. (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

De acordo com Yunes e Cechinel Filho (2001), aproximadamente 25% dos fármacos empregados nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores. Destacam-se dois tipos de produtos vegetais comercializados: fitoterápicos e fitofármacos. Fitoterápicos são aqueles medicamentos preparados exclusivamente à base de plantas medicinais. Fitofármacos são substâncias extraídas de plantas que apresentam atividades farmacológicas, podendo ter aplicação farmacêutica (GUERRA; NODARI, 2004).

Os produtos encontrados nas plantas são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo das plantas. Existem dois grupos de substâncias químicas vegetais, os primários e os secundários. Os metabólitos primários são essenciais a todos os seres vivos sendo representados por lipídios, proteínas, carboidratos e nucleotídeos. Os compostos secundários são aqueles produzidos por outras rotas metabólicas, muitas delas desconhecidas. Geralmente apresentam baixo peso molecular,

marcante atividade biológica e, diferentemente daqueles encontrados no metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas em determinados grupos de plantas (VON POSER; MENTZ, 2004).

A composição de metabólitos secundários nas plantas medicinais é influenciada por três fatores principais: hereditários, ontogenéticos e ambientais (ROBBERS, et al., 1997). A variabilidade na expressão do potencial genético, tipo de tecido da planta, fatores ambientais e período de colheita podem influenciar drasticamente o conteúdo dos metabólitos alvos (FRANÇA, 2004). Algumas classes de substâncias vegetais de origem secundária são: flavonóides, neolignanas, taninos, alcalóides, esteróis, terpenóides, dentre outros (ROBBERS et al., 1997).

Taninos são substâncias fenólicas, com massa entre 500 e 3000 Da, provenientes do metabolismo secundário de plantas, e são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. As atividades farmacológicas dos taninos se devem às propriedades de se complexar com macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos; com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); bem como ação antioxidante (SANTOS; MELLO, 1999). A capacidade de complexar proteínas salivares da cavidade oral caracteriza o sabor adstringente dos taninos, possibilitando seu reconhecimento em frutos verdes. A adstringência proporcionada pelos taninos protege a planta contra ataque de alguns patógenos e herbívoros (BUELGA ; SCALBERT, 2000).

Os taninos compreendem dois grupos: os hidrolisáveis (poliésteres de ácidos fenólicos) e os condensados (estrutura próxima dos flavonóides). Os taninos hidrolisáveis são constituídos por ésteres de um açúcar e de um número variável de ácidos fenólicos. Quando o ácido gálico está presente origina os galotaninos e os elagitaninos com ácido elágico (CUNHA et al., 2004).

Alguns estudos mostram a atividade antimicrobiana de determinados taninos. Existem algumas hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana. A primeira seria pela inibição de enzimas de fungos e bactérias pela complexação com substratos. Outra hipótese sugere que os taninos agem sobre membranas celulares dos microrganismos, alterando o seu metabolismo. Finalmente, a complexação com íons metálicos essenciais para o metabolismo do microrganismo (SANTOS; MELLO, 1999).

Poucos são os trabalhos científicos que relatam a atividade de produtos de plantas contra fungos dermatófitos. Aljabre et al. (2005) descreveram a atividade antifúngica de extrato éter de sementes de *Nigella sativa*, popularmente conhecida como cominho negro e

da substância isolada timoquinona contra fungos pertencentes aos três gêneros de dermatófitos. Estudo realizado por Gurgel et al. (2005) mostrou que látex vermelho (sangue de dragão) da espécie *Croton urucurana* apresenta atividade antifúngica contra três espécies do gênero *Trichophyton*, uma do gênero *Microsporum* e uma do gênero *Epidermophyton*. Extratos hidroalcoólicos 90% de folhas de *Piper regnellii* tiveram atividade fungicida e fungistática contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* (KOROISH et al., 2008).

3.3 *PUNICA GRANATUM*

A romãzeira, cujo nome científico é *Punica granatum* Linné (Punicaceae), é um arbusto decíduo frequentemente citado na medicina popular na Europa, Indo-China, Ilhas Filipinas, África do Sul (AJAIKUMAR et al., 2005) e Brasil.

O arbusto mede entre 3 e 5 metros de altura, com folhas opostas e fasciculadas, obtusas, brilhantes e alternadas. As flores são agrupadas em inflorescências terminais; elas possuem cálice suculento, parcialmente tubular (5 a 7 lobos), com dialipétalas, enrugadas, laranjas, vermelhas ou brancas. Os frutos são arredondados, de casca coriácea, com uma espécie de coroa no ápice, de cor amarelo-avermelhado. Quando bem maduros arrebentam-se expondo as sementes de coloração vermelho-clara, envolvidas por arilo suculento de sabor agradável, adocicado, adstringente e ácido, sendo comestíveis.

Vários compostos foram isolados de *P. granatum* como flavonóides, alcalóides, taninos condensados ou antocianidinas, elagitaninos e triterpenóides (LANSKY; NEWMAN, 2007). O pericarpo é rico em flavonóides e taninos (OZCAL; DINC, 1993 in LANSKY; NEWMAN, 2007). Os elagitaninos de romã apresentam efeito antiproliferativo, apoptótico e antioxidante (SEERAM et al., 2005).

O uso medicinal desta planta é conhecido desde a antiguidade. No Egito antigo, o fruto era símbolo de prosperidade e ambição, sendo comum a prática de decoração de sarcófagos com a planta. O seu uso foi descrito há cerca de 1500 a.C. no papiro de Erbers para tratamento antiparasitário, principalmente contra teníases (BRAGA et al., 2005). O fruto é utilizado para consumo humano, *in natura* ou na forma de sucos e geléias. Além disso, é amplamente utilizada como tratamento contra úlceras, danos hepáticos, doenças do coração, inflamação de garganta e estomatites (AJAIKUMAR et al., 2005). As cascas da planta e do fruto (pericarpo) são utilizadas contra disenteria, diarreia, bronquites e anti-parasitário contra helmintos (DAS et al., 1999). No Brasil é comum o preparo de chá do pericarpo de romã para

tratamento de infecções e inflamações na região laríngea, através do gargarejo. O pericarpo, caule, casca da raiz, folhas e flores são boas fontes de produtos secundários como taninos, pigmentos e alcalóides (MIRDEHGHAN; RAHEMI, 2007).

Nos últimos anos vem crescendo o interesse no âmbito acadêmico e industrial pela romã, principalmente por suas propriedades antioxidantes, atribuídas a seu elevado conteúdo de compostos polifenólicos e ao crescente número de indicações de compostos antioxidantes nas dietas (REDDY et al., 2007). Flavonóides isolados do fruto de *P. granatum* apresentaram atividade antioxidante quando adicionados à dieta de ratos (SUDHEESH; VIJAYALAKSHMI, 2005).

Vários estudos mostram as propriedades medicinais da romãzeira, muitas vezes confirmando a eficácia do uso popular para tratamento de algumas doenças. Ajaikumar et al. (2005) reportaram a atividade antiulcerogênica do extrato metanólico 70% da casca do fruto contra úlceras provocadas por etanol e aspirina, em ratos. Alkofahi & Atta (1999) realizaram estudo antiulcerogênico com extratos etanólicos de plantas utilizadas tradicionalmente na Jordânia. Ratos submetidos ao jejum de 48 horas foram tratados com 40 mg/kg de extratos administrados oralmente e posterior ingestão de etanol e aspirina para indução de úlceras gástricas. O extrato 80% de pericarpo de *P. granatum* foi responsável pela diminuição em 97,4% de úlceras, em comparação com o controle.

Das et al. (1999) mostraram atividade antidiarréica de extratos metanólicos de sementes da planta, utilizando ratos em jejum que receberam o extrato por via oral, uma hora antes da ingestão de óleo de rícino. Foi observado que o extrato reduziu a diarréia pela inibição da motilidade gastrointestinal.

O extrato metanólico também foi descrito por inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e a produção de enterotoxina (BRAGA et al., 2005). O extrato metanólico do pericarpo apresentou atividade contra *Proteus vulgaris* (1,5 mg/ml) e *Bacillus subtilis* (6 mg/ml) (PRASHANTH; ASHA; AMIT, 2001).

Em estudo sobre a atividade antibacteriana de plantas utilizadas popularmente no México, extratos metanólicos e aquosos obtidos do pericarpo de romã mostraram-se ativos com CIM (Concentração Inibitória Mínima) variando entre 1 - 4 mg/ml, com inibição de 100% do crescimento de *Shigella flexneri* (ALANÍS et al., 2005)

Testes com plantas medicinais utilizadas em Porto Rico mostraram que extrato metanólico de *P. granatum* foi ativo contra 13 espécies bacterianas, principalmente

Escherichia coli, *S. aureus*, *Micrococcus roseus* e *Micrococcus luteus* (MALÉNDREZ; CAPRILES, 2006).

Vasconcelos et al. (2003) estudaram o efeito do gel produzido a partir de extrato, obtido por percolação, do pericarpo de romã como tratamento de candidíases relacionadas a estomatites devido ao uso de próteses dentárias. Sessenta pacientes com este quadro clínico foram divididos nos grupos grupo A, tratados com miconazol de uso tópico, e B, tratados com gel de romã. Após 15 dias de tratamento, verificou-se a presença ou ausência de *Candida sp*, sendo que 25 e 23 pessoas dos grupos A e B, respectivamente, tiveram resultado do exame micológico negativo, mostrando que o gel foi eficaz contra estomatites ocasionadas por espécies de *Candida*.

Calzada et al. (2006) realizaram estudos sobre a sensibilidade de *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* a extratos de plantas utilizadas pela população mexicana para tratamento de distúrbios intestinais. O extrato metanólico de pericarpo de romã foi ativo contra *E. histolytica* com $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ (concentração que inibe o crescimento do parasita em 50%). Além disso, foi observada a atividade de óleo das sementes, suco e extrato aquoso do pericarpo de romã como estimuladores de reparação de injúrias epidérmicas e dérmicas (ASLAM et al., 2006).

Estudo realizado por Dell'Agli et al. (2009) mostrou atividade antimalária de extratos metanólicos de pericarpo com IC_{50} de 4,5 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ para cepas D10 e W2 de *Plasmodium falciparum*, respectivamente.

Reddy et al. (2007) descreveram o potencial antioxidante de *P. granatum*, além da atividade antimalária e antimicrobiana de frações ricas em taninos, elagitaninos e ácidos fenólicos. O elagitanino punicalagina apresentou CIM de 18,4 $\mu\text{g/ml}$ contra *Cryptococcus neoformans*, sendo inativo contra *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e contra as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Estudo realizado por Al-Zoreky et al. (2009) mostrou que o extrato metanólico de casca de romã inibiu o crescimento de *Aspergillus niger*, *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Atividade de polifenóis extraídos de *P. granatum* foi determinada contra fungos fitopatogênicos, sendo bastante eficazes contra *Colletotricum truncatum*, *Colletotricum coccodes* e *Rhizoctonia solani* (OSORIO et al., 2009).

Recentemente foi estudada ação anti-inflamatória de taninos isolados do pericarpo de romã. Verificou-se que punicalin, punicalagina, strictinina e granatin B têm ação anti-inflamatória sendo que o último apresentou melhor resultado (LEE et al., 2010).

A atividade contra influenza A/Hong kong/2/68, H3N2 [A/HK (H3N2)] foi realizada por Haidari et al. (2009) e mostrou que polifenóis de *P. granatum* é virucida provavelmente pela inibição da replicação viral. Além do mais apresentou sinergismo com osetalmivir.

Estudo de plantas medicinais utilizadas no Brasil, realizado em nossos laboratórios, mostrou a atividade de extratos de romã contra bactérias e leveduras, com CIM de 62,4 µg/ml contra *S. aureus* e 15,6 µg/ml contra *Candida krusei* e *C. tropicalis* (HOLETZ et al. 2002).

Devido ao amplo uso da Romã na medicina tradicional e sua comprovada ação contra diversos microrganismos, este trabalho traz uma nova abordagem sobre a atividade antidermatófito da planta.

REFERÊNCIAS

- AJAIKUMAR, K. B.; ASHEEF, M.; BABU, B. H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 171-176, 2005.
- ALANÍS, A. D.; CALZADA, F.; CERVANTES, J. A.; TORRES, J.; CEBALLOS, G. M. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Ethnopharmacology**, v. 100, p. 153-157, 2005.
- ALJABRE, S. H. M.; RANDHAWA, M. A.; AKHTAR, N.; ALAKLOBY, O.M.; ALAKLOBY, O. M.; ALQURASHI, A. M.; ALDOSSARY, A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 116-119, 2005.
- ALKOFAHI, A.; ATTA, A. H. Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. **Ethnopharmacology**, v. 67, p. 341-345, 1999.
- ALY, R.. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **Journal of American Academy of Dermatology**. vol. 31, nº3, part 2, p. s21-s25, 1994.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 244-248, 2009.
- ASLAM, M. N.; LANSKY, E. P.; VARANI, J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p. 311-318, 2006.
- ASLAM, N. M.; LANSKY, E. P.; VRANI, J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen syntesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in humam skin cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p. 311-318, 2006.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.505-535, 2005.
- BLANCO, M. F.; MAZZINI, M. A. **Clínica Dermatológica e Sifilográfica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1948. p. 732.
- BRAGA, L.C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J. A.; CARMO, L. S.; SOUZA, E.C.; NASCIMENTO, A. M. A. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 335-339, 2005.
- BUELGA, C. S., SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 80, p. 1094 – 1117, 2000.
- CALIXTO, J. B. **Estudo Farmacológico pré-clínico de plantas medicinais**. p. 77 a 99 In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais** sob a ótica da química medicinal moderna. Santa Catarina: Argos, 2001. 713 p.

CALZADA, F.; YÉPEZ-MULIA, L.; AGUILAR, A. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Ethnopharmacology**, v. 108, p. 367-370, 2006.

COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SILVA, M. V.; RODRIGUES, B. A.; FERNANDES, O. F. L.; SOARES, A. J.; SILVA, M. R. R. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 4, p. 367-371, 1999.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R.; CUNHA, E. **Plantas e Produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DAMÁZIO, P. M. R. B. C.; LACERDA, H. R.; LACERDA FILHO, A. M.; MAGALHÃES, O. M. C.; NEVES, R. P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. Uberaba: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, p. 484-486, 2007.

DAS, A.K.; MANDAL, S. C.; BANERJEE, S. K.; SINHA, S.; DAS, J.; SAHA, B. P.; PAL, M. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 205-208, 1999.

DELL'AGLI, M.; GALLI, G. V.; CORBETT, Y, TARAMELLI, D.; LUCANTONI, L.; HABLUETZEL, A.; MASCHI, O.; CARUSO, D.; GIAVARINI, F.; ROMEO, S.; BHATTACHARYA, D.; BOSISIO, E. Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, p. 279-285, 2009.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista (Unesp), 1996. p. 10.

DUEK, L.; KAUFMAN, G.; ULMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **Journal of Infection**, v. 48, p. 175-180, 2004.

FOSTER, K. W.; GHANNOUM, M. A.; ELEWSKI, B. E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **The Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 50, p. 748-752, 2004.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. *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. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina/ Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, nº3, p. 454-500, 1999.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade, Fitoterápicos e Fitofármacos. *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. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina/ Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p.

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

H Aidari, M.; Ali, M.; Casscells III, S. W.; Madjid, M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. **Phytotherapy**. v. 16, p. 1127 – 1136, 2009.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 1027 – 1031, 2002.

JOHNSON, L. Dermatophytes – The skin eaters. Cambridge: **Mycologist**. v. 17, p.147 – 149, 2003.

KAUFMAN, G.; HORWITS, B. A.; DUEK, L.; ULLMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology**, v. 45, p. 149-155, 2007.

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. 7. ed. São Paulo: Sarvier, 1984. p. 479.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 177-206, 2007.

LEE, C. J.; CHEN, L. G.; LIANG, W. L.; WANG, C. C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, v. 118, p. 315-322, 2010.

LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; BENEVENGA, J. P. Dermatofitoses humanas no interior do Rio Grande do Sul no período de 1989-1992. São Paulo: Revista **do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 36, p. 115-119, 1994.

MALÉNDREZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytotherapy**, v. 13, p. 272-276, 2006.

MARQUES, V. R. B. **Natureza em boiões: medicinais e boticários no Brasil setecentista**. Campinas: UNICAMP, 1999, 350 p.

MASRI-FRIDLING, G. D. Dermatophytosis of the feet. **Dermatologic Clinics**. v. 14, nº1, p. 33 – 40, 1996.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R.; ANDERSON, R. M. **Medical Microbiology**. 1ª ed. Londres: Mosby-Year Book Europe Limited, 1993, p. 28.1 – 28.29.

MIRDEHGHAN, S. H.; RAHEMI, M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 120-127, 2007.

NIMURA, K.; NIWANO, Y.; ISHIDUKA, S. FUKUMOTO, R. Comparison of in vitro antifungal activities of topical antimycotics launched in 1990s in Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 173-178, 2001.

ODDS, F. C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycologist**, v. 17, part 2, p. 51-55, 2003.

OGAWA, H.; SUMMERBEL, R.C., CLEMONS, K. V.; KOGA, T.; RAN, Y.P.; RASHID, A.; SOHNLE, P. G.; STEVENS, D.A.; TSUBOI, R. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. **Journal of Medical Mycology**, v.36, 166-173, 1998. *In*: BAEZA, L. C.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A.; GIANNINI, M. J. S. M. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes and Infection** v.9, p.1415-1421, 2007.

OSORIO, E.; FLORES, M.; HERNÁNDEZ, D.; VENTURA, J.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Biological efficiency of polyphenolic extract of pecan nuts shell (*Carya illionensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, p. 1-5, 2009.

OZCAL, N. DINC, S. Evaluation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. **Eczacılık Fakültesi Dergisi** v. 22, p. 21–29, 1993. *In*: LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 177-206, 2007.

PELEGRINI, A.; TAKAHASHI, J. P.; PEREIRA, C. Q. M.; PESSONI, R. B.; SOUZA, M. C. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 26, p. 118-120, 2009.

PRASHANT,D.; ASHA, M. K.; AMIT, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 171-173, 2001.

REDDY, M.K.; GUPTA, S. K.; JACOB, M. R.; KHAN, S. I.; FERREIRA, D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. **Planta Med.** 2007.

RINALDI, M.G.; Dermatophytosis: Epidemiological and microbiological update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, nº 5, p. s-120-s124, 2000.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocologia**. Editora: Premier, 1997. p. 372.

SALLES, J. M. C.; SALLES, M. J. C.; **Antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários): Quando indicar, como usar**. Editora universitária UFPA, 2000, p.518.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3^a ed. São Paulo: Artes Médicas Ltda, 2008. p. 703-722.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. *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**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina/ Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. p. 517-544.

SCHWARTZ, R. A. Superficial Fungal Infections. New Jersey: **Dermatology**. v. 364, p. 1173-1182, 2004.

SEÇKIN, D.; HABERAL, M. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* with concomitant disseminated nocardiosis in a renal transplant recipient. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 51, n^o5, p. s173 – s176, 2004.

SEEBACHER, C. Action mechanisms of modern antifungal agents and resulting problems in the management of onychomycosis. **Mycoses**. v. 46, p. 506-510, 2003.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutricional Biochemistry**, v. 16, p. 360-367, 2005.

SIQUEIRA, E. R.; FERREIRA, J.C.; MAFFEI, C. M. L.; CANDIDO, R. C.; Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos de estudantes universitários. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, p. 269-271, 2006.

SUDHEESH, S.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoid from *Punica granatum* – potential antiperoxidative agents. **Fitoterapia**. v. 76, p. 181 – 186, 2005.

SUDHEESH, S.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoid from *Punica granatum* – potential antiperoxidative agents. **Fitoterapia**. v. 76, p. 181-186, 2005.

TSANG, P.; JIMENEZ-LUCHO, V. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a patient with AIDS. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 34, n^o6, p. 1090 – 1091, 1996.

VASCONCELOS, L. C. S.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; HIGINO, J. S. Use of *Punica granatum* as na antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, v. 46, p. 192-196, 2003.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e sistemas de Classificação. *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. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina/ Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p.

WATANABE K.; TANIGUDHI, H.; KATOH, T. Adhesion of dermatophytes to healthy feet and its simple treatment. Alemanha: **Mycoses**. v. 43, p. 45 - 50, 2000.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve análise histórica da química de plantas medicinais:** sua importância atual, concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. p. 19 - 46. *In:* YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais** sob a ótica da química medicinal moderna. Santa Catarina: Argos, 2001. 713 p.

ZAITIS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. L.; RUIZ, L. R.; SOUZA, V. M. **Copêndio de Micologia Médica.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1998, p. 81-98.

4 ARTIGO

***IN VITRO* ANTIDERMATOPHYTE ACTIVITY AND POSSIBLE MECHANISMS OF
ACTION OF POMEGRANATE FRUIT PEEL EXTRACT AND THE ISOLATED
SUBSTANCE PUNICALAGIN**

**Simone Rochtaschel Foss, Celso Vataru Nakamura, Tania Ueda Nakamura, Diógenes
Aparício Garcia Cortez, Benedito Prado Dias Filho.**

IN VITRO ANTIDERMATOPHYTE ACTIVITY AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION OF POMEGRANATE FRUIT PEEL EXTRACT AND THE ISOLATED SUBSTANCE PUNICALAGIN

Simone Rochtaschel Foss¹, Celso Vataru Nakamura², Tania Ueda Nakamura³, Diógenes Aparício Garcia Cortez, ² Benedito Prado Dias Filho².

SHORT TITLE: **IN VITRO ANTIDERMATOPHYTE OF POMEGRANATE FRUIT PEEL EXTRACT**

Summar

Dermatophytes are fungi that infect the epidermis and appendages, often with serious social and health-economic consequences. The hydroalcoholic extract of pomegranate fruit peel showed activity against the dermatophyte fungi *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*, and *M. gypseum*, with MICs of 125 µg/ml and 250 µg/ml, respectively for each genus. The extract was fractionated by liquid-liquid partition, and the water fraction was subjected to further isolation of the active substance. Punicalagin was isolated in a Sephadex LH-20 column, followed by a Lobar C-18 column, and identified by spectroscopic analysis. The crude extract and punicalagin showed activity against the conidial and hyphal stages of the fungi. Punicalagin and the crude extract showed nearly the same active concentrations, because punicalagin is the major substance in the fruit peel. The mechanism of action of the crude extract is unclear, but our experiments provided evidence that it does not affect the membrane ergosterol or the chitin wall, because no morphological changes were observed. The cytotoxicity assay showed that the crude extract and punicalagin are more selective for fungus cells than for mammalian cells. These results indicated that the crude extract and punicalagin had a greater antifungal activity against *T. rubrum*, indicating that the pomegranate is a good target of study for obtaining a new antidermatophyte medicine.

Keywords: Dermatophyte. Natural products. *Punica granatum*. *Trichophyton rubrum*. pomegranate.

¹Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

² Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil. Correspondence: Benedito Prado Dias Filho, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020- 900, Maringá, PR, Brazil, fax +55-44-3261-4860. E-mail address: bpdfilho@uem.br

³ Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

Introduction

The dermatophytes are fungi that use keratin for their nutrition, and may cause infections of the nails, skin, and hair. These organisms are classified in three genera: *Epidermophyton*, *Trichophyton*, and *Microsporum* [1]. Dermatophytosis may affect several areas of the body, including the foot, hand, body, beard, hair, nails, and crural region. Although not life-threatening, superficial mycoses due to dermatophyte fungi have been among the most common communicable diseases of humans since antiquity, and have considerable social and health-economic implications [2].

Generally, dermatophytes infect the superficial layers of skin. However, immunocompromised patients, such as AIDS patients or recipients of kidney transplants, can be affected by deep injury in the dermal layer, resulting in disseminated lesions that may take fatal forms [3-6], . Although many antifungals are available, their side effects and drug interactions, and the existence of resistant organisms have created a need to find safer and more effective treatments [7] . Also, dermatophyte treatments are, in general, expensive and must be applied over long periods.

Natural products have proven to be an alternative source of new active molecules. In many countries, mainly in developing countries, plants have been used as the primary basic health treatment. The pomegranate *Punica granatum* is a bush 3 to 5 meters in height, with opposite and obtuse leaves, and flowers with wrinkled white, yellow, or orange petals. The fruit is composed of a yellow to red peel that covers the seeds, the fleshy arils of which are eaten. The family Punicaceae comprises *Punica granatum* and *Punica protopunica*, the latter found only on Socotra, an island off the Yemeni coast [8]. *Punica granatum* is a plant with worldwide application in folk medicine. There are references to an antimicrobial effect of pomegranate products against many pathogenic bacterial species [9-11], antiplasmodial activity, and effects against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* [12]. Polyphenols extracted from pomegranate fruit rind were active against phytopathogenic fungi [13]. The extract of *P. granatum* showed good results as a topical antifungal agent for the treatment of candidosis associated with denture stomatitis [14]. Punicalagin is a tannin, and is the majority component of pomegranate fruit peel. This substance was isolated not only from *Punica granatum*, but also was described from *Terminallia mollis* and *Terminallia brachystemma*, as having antifungal activity against *Candida albicans*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis* [15].

The present study evaluated the antidermatophyte activity of pomegranate fruit peel extract, to investigate its effect on different fungal development stages, cytotoxicity, and possible mechanisms of action. The active substance of pomegranate was isolated and identified as well.

Materials and methods

Plant material and crude extract

Punica granatum fruits were collected in December 2007 in Maringá, Paraná, Brazil. The peel was separated manually (2183.8 g) and extracted with a 90% (v/v) hydroalcoholic solution, by maceration at room temperature for 5 days in a dark room. The hydroalcoholic extracts were filtered, evaporated under vacuum at 40°C, lyophilized, and kept in a freezer at -10°C. The crude extract was assayed against four species of dermatophyte fungus, and Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Isolation of the active substance

First, 200 ml of an aqueous solution of the crude extract (20 g) was submitted to liquid-liquid partition, and eluted with ethyl acetate and then with *n*-butanol; this procedure was followed four times with each solvent, resulting in three fractions: F1 (water), F2 (ethyl acetate), and F3 (*n*-butanol). The collected fractions were evaporated under vacuum and lyophilized in the same conditions as for the extract. Second, 0.5 g of the fraction with the best activity (F1) was dissolved in water, filtered through cotton wool and then placed in a Sephadex LH-20 column. The procedure was performed twice to maximize the yield. It was monitored by thin-layer chromatography (TLC), mobile phase *n*-butanol: acetic acid: water (40:10:50), and observes as a natural yellow substance. Finally, after antifungal tests, the active subfraction was placed in a Lobar (C-18) column and eluted with methanol:water (1:1), also monitored by TLC.

The structure of the active compound was established with the use of spectroscopic methods (EI-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, H-H COSY, HMBC, HMQC, and DEPT). The substance was tested against *Trichophyton rubrum*.

Microorganisms used and growth conditions

The dermatophyte species used for this investigation were: *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 1481, and *Trichophyton rubrum* ATCC 28189. The fungi were maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) slants at 28°C and subcultured monthly throughout the study.

Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* and Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were also investigated, because secondary infections may occur in dermatophytoses. The bacterial strains were maintained in Mueller-Hinton Agar at 36°C and subcultured weekly throughout the study.

Antibacterial activity assay

The antibacterial assay of the extract was carried out by the microboth dilution method. The inoculum was set by the McFarland scale at 10^8 cell/ml.

Antifungal activity assay

The antifungal activity of the extract, fractions, and isolated substance was evaluated by the microbroth dilution assay, conidial germination inhibition, hyphal growth inhibition, and fungus cell-wall integrity analysis. Fungi were grown on Sabouraud dextrose agar) plates for 7–14 days, after which time spores were harvested from sporulating colonies and suspended in a sterile ion solution. The concentrations of spores in suspension were determined using a hemocytometer, and adjusted to 1.0×10^5 spores/ml.

Microbroth dilution assay

The antifungal and antibacterial assays were performed by microdilution techniques in sterile flat-bottom microplates [16]. Each well contained appropriate test samples, RPMI, and approximately 10^8 cells for bacteria, and 10^5 spores in a total volume of 100 μ l. The plates were incubated at 28°C, 24 h for bacteria and 72 h for dermatophytes. Two susceptibility endpoints were recorded for each isolate. The MIC was defined as the lowest

concentration of a compound at which the microorganism tested did not demonstrate visible growth. To determine the minimal fungicidal effect, 10 µl of suspension from the MIC was spotted in Sabouraud agar and incubated for 24 to 72 h at 28°C. The minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest concentration that yielded negative subcultures or only one colony.

Conidial germination inhibition

Various concentrations of the test samples in 90 µl were prepared in 96-well flat-bottom micro-culture plates by the double dilution method. The wells were prepared in duplicate for each concentration. The wells were inoculated with 10 µl of spore suspension containing 2000–3000 spores. The plates were incubated at 28°C for 24 h and then examined for spore germination, under an inverted microscope. For analysis, spores were considered germinated if they had a germ tube at least twice the length of the spore.

Hyphal growth inhibition

Hyphal growth inhibition was evaluated by the disc diffusion method. Plates with SDA were centrally inoculated with *T. rubrum* and incubated at 28°C for 3-5 days (the time necessary for the colony to reach 2 cm in diameter). Sterile paper-filter discs received 10 µl of the test concentration of the solution. Test discs were made with the extract, punicalagin, and Nystatin, with concentrations close to the MIC. These discs and one control disc (with 10 µl of sterile water) were arranged around the colony on the plate, at a distance of 0.5 cm, and incubated at 28°C for 72 h. The hyphal growth inhibition was evaluated visually, and photographed.

Fungus cell-wall integrity analysis

This study was designed to determine if the extract and punicalagin were able to bind with some wall component, resulting in morphological alterations. Calcofluor White has the property to react with chitin, showing fluorescent blue images, which were used to analyze the hyphal morphology.

Sub-inhibitory concentrations of the crude extract in 500 μ l were prepared by the double-dilution method, in 24-well flat-bottom micro-culture plates, on which round cover slips were placed. The wells were prepared in duplicate for each concentration. The wells were inoculated with 50 μ l of spore suspension, containing 10,000–15,000 spores. The plates were incubated at 28 °C for 24 h and 48 h. Then, the cover slips were carefully removed and washed in PBS, pH 7.2, with light manual shaking. Next, the medium was carefully removed and cover slips with adhered cells were treated with 1.25 mg of Calcofluor White M2R (Sigma, St. Louis, MO, USA) in 100 ml H₂O for 15 min and mounted on a slide with synthetic resin (Araldite 502™). Slides were viewed by means of a Zeiss fluorescent microscope.

Ergosterol effect assay

This assay was based on Sortino et al. [17] and Yamaguchi et al. [18], to study substances which have the property of complexing with membrane ergosterol, such as Amphotericin B. Briefly, MICs for the extract and amphotericin (control) were determined by the microbroth dilution assay (described above) in the presence of different concentrations of exogen ergosterol (500, 250, 125, 62.5, and 31.25 μ g/ml). The results were organized in a graph showing the ergosterol concentrations on the x axis and the MIC values on the y axis.

Cytotoxicity assay

Confluent Vero cell monolayers grown in 96-well cell-culture plates were incubated with a tenfold serial dilution of the pure compound - starting with a concentration of 1000 mg/ml - for 48 h at 37 °C and 5% CO₂. At that time, cultures fixed with 10% trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C were stained for 30 min with 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid and subsequently washed with distilled water. Bound SRB was solubilized with 150 μ l 10 mM Tris-base solution. Absorbance was read in an ELISA plate reader at 530 nm. The cytotoxicity was expressed as a percentage of the optical density compared to the control.

Results

The bioactive-guided purification of the hydroalcoholic extract by liquid-liquid partition, followed by Sephadex LH-20 and Lobar (C-18), resulted in punicalagin as the most active isolated substance. From 2183.8 g of pomegranate fruit peel, 220.6 g of crude extract was obtained, a yield of 10.1%. The liquid-liquid partition obtained 46% of P1, 12% P2, and 31.4% P3. From 1 g of P1 submitted to a Sephadex LH-20 column followed by a Lobar C-18 column, 123.9 mg of punicalagin was obtained, yielding 12.39% in relation to fraction P1.

Punicalagin FAB-MS at m/z 1083.4 found $C_{48}H_{28}O_{30}$. The ^{13}C results: δ 88.78 (C-1), 69.73(C-2), 75.33 (C-3), 73.13 (C-4), 65.38 (C-5), 63.23 (C-6), 168.26 (C-7), 124.59 (C-8), 105.61/108.71 (C-9), 144.72 (C-10), 135.67 (C-11), 144.72 (C-12), 114.42 (C-13), 113.87 (C-14), 144.62 (C-15), 135.5 (C-16), 144.4 (C-17), 105.02/108.71 (C-18), 124.24 (C-19), 168.45/148.57 (C-20), 167.6 (C-21), 123.57 (C-22), 109.51 (C-23), 144.39 (C-24), 137.76 (C-25), 144.39 (C-26), 117.7 (C-27), 109.51 (C-28), 147.35 (C-29), 136.86 (C-30), 135.5 (C-31), 112/113.37 (C-32), 121.75/121.87 (C-33), 157.81 (C-34), 112.56/113.37 (C-35), 135.18 (C-36), 136.86/139.2 (C-37), 147.35 (C-38), 109.51 (C-39), 121.75/121.87 (C-40), 157.3 (C-41), 113.87 (C-42), 144.36 (C-43), 134.88 (C-44), 144.11 (C-45), 105.02/108.71 (C-46), 124.59 (C-47), 168.20 (C-48). HMBC 1H - ^{13}C and 1H results: 5.06/5.13 (H-C1, *m*), 4.65/4.71 (H-C2, *m*), 5.06/5.13 (H-C3, *m*), 4.65/4.71 (H-C4, *m*), 3.09/3.17 (H-C5, *m*), 4.03 (H α -C6, *m*), 1.83 (H β -C6, *d*), 6.39/6.41 (H-C9, *s*), 6.28/6.41 (H-C18, *s*), 6.7 (H-C23, *s*), 6.28/6.41 (H-C46, *s*).

The crude extract had a considerable effect against both genera *Trichophyton* and *Microsporum* (Table 1) with MIC of 125 and 250 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The crude extract from pomegranate also showed activity against *S. aureus* and *B. subtilis* (MIC= 62.5 $\mu\text{g/ml}$). The results of specific tests against the dermatophyte *T. rubrum* are presented in Table 2. The isolated molecule punicalagin showed nearly the same MIC value as the crude extract, probably because punicalagin is the majority substance. The control molecule, Nystatin, showed an MIC of 0.39 $\mu\text{g/ml}$ for all dermatophytes tested (data not shown). After the dermatophyte was spotted from the MIC plates to Sabouraud agar plates, the fungicidal activity was determined. Punicalagin showed fungicidal activity at 125 $\mu\text{g/ml}$ against *T. rubrum*. Conidial germination inhibition (CGI) showed the effect of inhibitory concentrations of the crude extract fraction, and punicalagin at 62.5 $\mu\text{g/ml}$. The MIC concentration of

Nystatin was able to inhibit conidial germination (data not shown). The concentration of punicalagin with 50% cytotoxicity (CC₅₀ value) on Vero cell was 400 µg/ml.

Table 1 – Minimal inhibitory concentration (MIC) of crude extract of *Punica granatum* against bacteria and dermatophytes

Microorganisms	MIC (µg/ml)
Bacteria	
<i>Staphylococcus. aureus</i>	62.5
<i>Bacillus subtilis</i>	62.5
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	250
<i>Escherichia coli</i>	>1000
Dermatophytes	
<i>Trichophyton rubrum</i>	125
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	125
<i>Microsporum gypseum</i>	250
<i>Microsporum canis</i>	250

Table 2 – Minimal inhibitory concentration (MIC), minimal fungicidal concentration (MFC) and conidial germination inhibition (CGI), of pomegranate fruit peel extract, fractions and the isolated substance punicalagin

	Antifungal activity (µg/ml) against <i>Trichophyton rubrum</i>		
	MIC	MFC	CGI
Crude extract	125	250	62.5
Fractions			
P1	125	125	62.5
P2	250	250	-
P3	125	125	-
Punicalagin	62.5	125	62.5

The hyphal growth inhibition is shown with diffusion of punicalagin and Nystatin in the agar, which makes the control disc (water disc) visible, in Figure 1. Figure 2 shows the images from the fungus cell-wall integrity assay carried out with calcofluor white.

Difference in the morphology of inhibited hyphae was not apparent between fungi treated with crude extract, isolated compound punicalagin and those treated with Nystatin.

In the ergosterol effect assay, amphotericin-B showed a significant increase in MIC value; on the other hand, the crude extract was not affected by the ergosterol, maintaining the same MIC value as without ergosterol (data not shown). The cytotoxicity was monitored using SRB assays. Cell viability after exposure to 100 $\mu\text{g/ml}$ of crude extract, fraction P1, and punicalagin was 83%, 99%, and 90%, respectively (data not shown). The concentration of punicalagin with 50% cytotoxicity on Vero Cell (CC_{50} value) was 400 $\mu\text{g/ml}$, thus 6.4 times exceeding its MIC value.

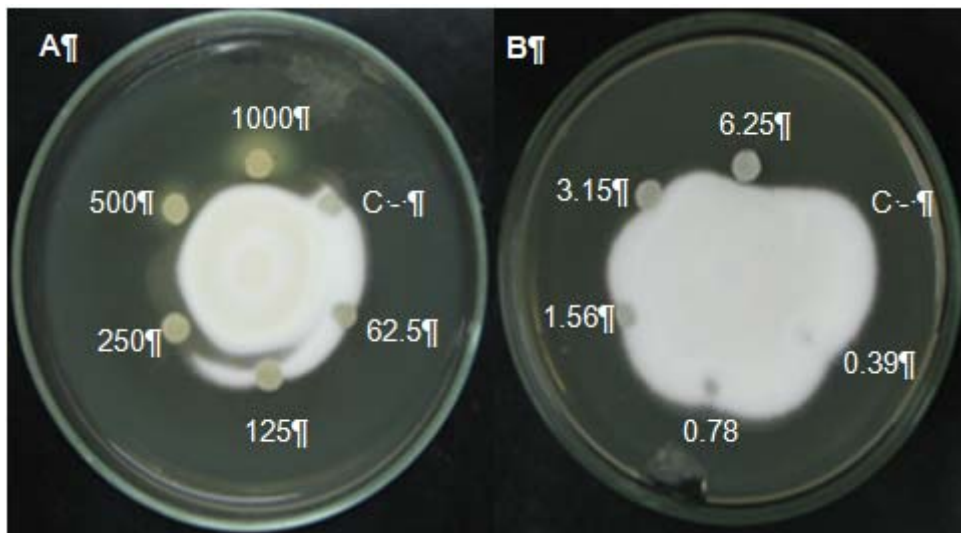


Figure 1 – Antifungal activity in solid medium against *T. rubrum*. Hyphal growth inhibition was evaluated by the disc diffusion method. **(A)** Crude extract – 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$. **(B)** Nystatin – 6.25, 3.15, 1.56, 0.78, 0.39 $\mu\text{g/ml}$. The water was used as control. Data correspond to one representative experiment out of three.

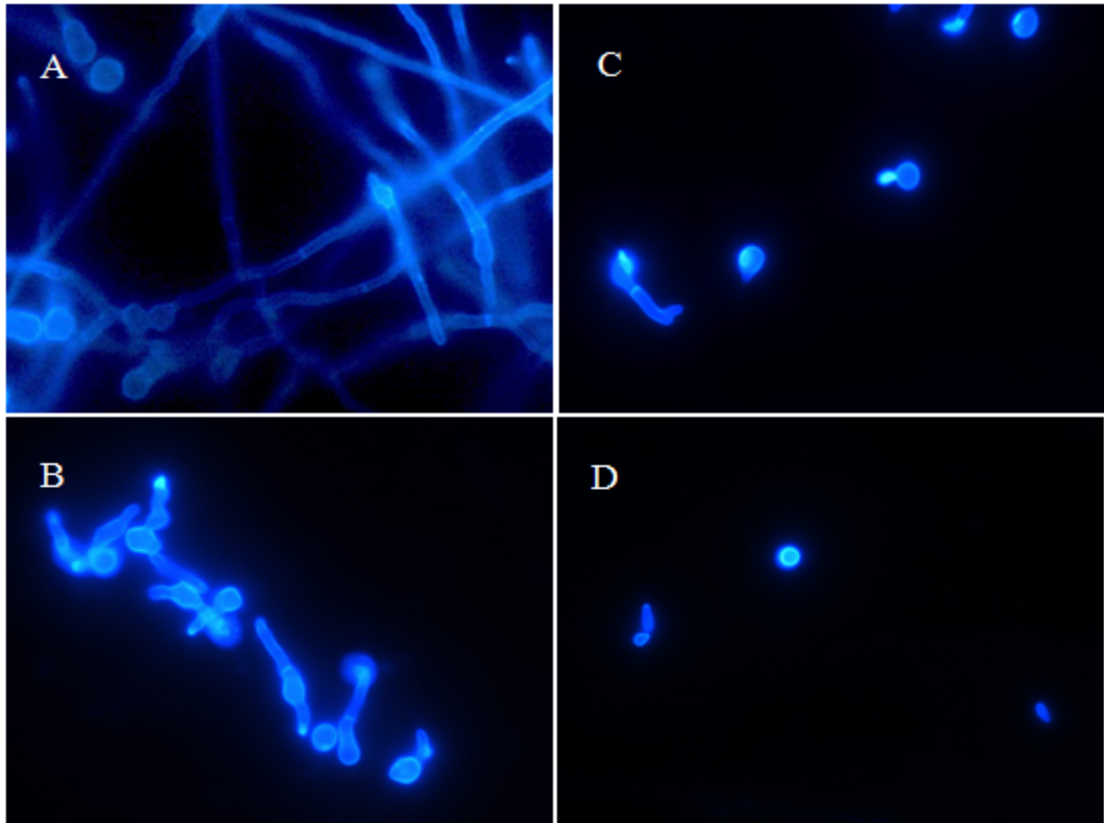


Figure 2 – Spore germination inhibition of *Trichophyton rubrum* on cover slips. (A) Control; (B) 125 µg/ml crude extract; (C) 62.5 µg/ml punicalagin; (D) 0.78 µg/ml Nystatin. Data correspond to one representative experiment out of three.

Discussion

Pomegranate fruit peel is rich in tannins. These are high-molecular-weight plant polyphenols, which can be divided into two chemically and biologically distinct groups: condensed tannin and hydrolyzable tannin, the latter composed of phenolic acids and glycosyl esters. Hydrolyzable tannins are separated into ellagitannins (containing ellagic acid) and gallotannins (containing gallic acid) [19]. Punicalagin is an ellagitannin, and it was obtained by successive bioactive-guided steps. Punicalagin has been isolated from plants [20] by different methods. However, some of the isolation techniques, such as high-speed countercurrent chromatography, require expensive apparatus [21]. The present method is a less expensive alternative to obtain punicalagin with excellent results, and resembles a purification procedure determined by SEERAM et al. [22]. The spectral analysis was compared with that reported by DOIG et al. [23], which confirmed the isolated substance as punicalagin. The mass spectrum (EI-MS) of the punicalagin isolated conformed to that

reported by SEERAM et al.. [22]. The punicalagin anomers can be observed in the mass spectrum, which show double chemical shifts at the same carbon or hydrogen.

The crude extract was able to inhibit both genera *Trichophyton* and *Microsporum*, at 125 and 250 µg/ml, respectively. The minimal fungicidal concentration of the crude extract against *T. rubrum* was within two-twofold dilution of the MIC for this organism. Plant products tested for use against dermatophytes have shown activity against *T. rubrum* [24-28].

The aim is to obtain a substance that can be used in the clinical setting, acting through biochemical pathways that are present in human and fungal cells, both eukaryotic. The crude extract and punicalagin from pomegranate presented a good activity against the dermatophyte fungus *T. rubrum* with MICs of 62.5 and 125 µg/ml, respectively.

There are two phases of fungal growth, spore germination and hyphal growth, where drug action can occur. The hyphal growth inhibition was analyzed and the extract, fraction, and isolated molecule punicalagin showed inhibition at a concentration of 62.5 µg/ml. This is particularly noteworthy because the MICs of crude extract and fraction extract were found to be 125 µg/ml. This similar effect of the extract and isolated substance is due to the fact that punicalagin is the majority substance in the pomegranate fruit peel [21].

Amphotericin B is a well-known membrane-disruptive agent, which has a direct effect on membranes and is lethal to fungi. It forms stable pores in the membrane by complexing with ergosterol, which results in permeability to several ions [29]. The ergosterol assay showed that the crude extract and its majority substance punicalagin do not act on the membrane ergosterol. Similar behavior of amphotericin B was observed by Yamagushi et al.[17], who carried out the ergosterol assay of a synthetic substance and amphotericin-B as control.

During the course of this work, *T. rubrum* growth inhibition was routinely checked. The growth forms were directly evaluated on the glass surface by fluorescence staining with the optical brightener Calcofluor White M2R. Although no morphological alterations were detected, this procedure was important to understand and confirm the results of the conidial germination inhibition, using the same incubation conditions. This may be explained by the nature of the principal substance, punicalagin, which is a tannin. The tannins could act on the microorganism cell membrane, switching its metabolism; complexation with metallic ions needed for the microorganism's metabolism; and can inhibit enzymes of fungal and bacteria cells, by complexation with substrates [30].

In addition, the selectivity showed that punicalagin is 6.4 times more selective for fungi cells than for mammal cells, indicating that the crude extract may be ideal for use in topical form. The values of CC_{50} of punicalagin are similar to those found by Kulkarni et al. [31], who calculated the CC_{50} as 460 $\mu\text{g/ml}$. Vidal et al. [32] evaluated the acute toxicity *in vivo*, using Wistar rats with intranasal administration, and detected that the LD_{50} (the dose that can kill 50% of the assayed animals) was 731 mg/ml. Pomegranate juice may contain 2 g/L of punicalagin. Sprague-Dawley rats fed a diet containing 6% punicalagin, for 37 days, showed no toxicity [33]. These data support the initial idea of a treatment with crude extract of pomegranate fruit peel, in the topical and oral forms.

Under certain conditions, dermatophytosis can be complicated by secondary bacterial infections. Therefore, we investigated whether the hydroalcoholic extract exerts, in addition to its antifungal effects, a significant antibacterial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. The crude extract from pomegranate of showed good activity on both *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *P. aeruginosa* with MICs of 62.5, 62.5 and 250 $\mu\text{g/ml}$. *E. coli* MIC >1000 $\mu\text{g/ml}$ were considered resistant.

The antidermatophyte assay, using *Trichophyton rubrum* as a model, showed that the crude extract acts on conidial and hyphal structures. Although the mechanisms of action were not elucidated, we eliminated the possibility of complexation with the membrane ergosterol, and observed no change in the morphology of the hyphal structures. Also, the cytotoxicity assay showed that punicalagin was more selective for fungal than mammal cells, indicating its probable best use in clinical applications. Further studies are necessary to show the true potential of the crude extract of pomegranate fruit peel as an antidermatophyte medicine.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Capacitação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (Capes), Fundação Araucária, and Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá. Part of the experiments were carried out at the Complexo de Central de Apoio a Pesquisa (COMCAP) MCT/FINEP/UEM.

REFERENCES

1. Rinaldi MG. Dermatophytosis: Epidemiological and microbiological update. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2000. **43**: 120-124.
2. Johnson L. Dermatophytes- the skin eaters. *Mycologist* 2003; **17**: 147-149.
3. Tsang P, Jimenez-Lucho V. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a patient with AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1996; **34**: 1090-1091.
4. Seçkin D, Haberal M. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* with concomitant disseminated nocardiosis in a renal transplant recipient. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004, **51**: 173-176.
5. Pelegrini A, Takahashi JP, Pereira CQM, Pessoni RB, Souza MC. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología* 2009. **26**: 118-120.
6. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 2004, **10**: 48-66.
7. Straten MRV, Hossain MA, Ghannoum MA. Cutaneous infections Dermatophytosis, onychomycosis and *Tinea versicolor*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2003. **17**: 87-112.
8. Lanski EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology* 2007. **109**: 177-206.
9. Meléndrez PA, Capriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine* 2006. **13**: 272-276.
10. [10] Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *International Journal of Food Microbiology* 2009. **134**: 244-248.
11. Dell'Agli M, Galli GV, Corbett Y, Taramelli D, Lucantoni L, Habluetzel A, Maschi O, Caruso D, Giavarini F, Romeo S, Bhattacharia D, Bosisio E. Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. *Journal of Ethnopharmacology* 2009. **125**: 279-285.
12. Calzada F, Yépez-Mulia L, Aguilar A. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 2006. **108**: 367-370.
13. Osorio E, Flores M, Hernández D, Ventura J, Rodríguez R, Aguilar CN. Biological Efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts Shell (*Carya illionensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Iarrea tridentate* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 2009. doi:10.1016/j.indcrop.2009.09.017

14. Vasconcelos LCS, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as na antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*, 2003. **46**:192-196.
15. Liu M, Katerere DR, Gray AI, Seidel V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. *Fitoterapia* 2009. **80**:369-373
16. NCCLS Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing: Eight International Supplement. Wayne PA, **M100-S14**.
17. Sortino M, Delgado P, Juarez S, et al. Synthesis and antifungal activity of (Z)-arylidennerhodanines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007. **15**: 484-494.
18. Yamaguchi MU, Silva APB, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Silva CC, Nakamura CV. Effects of Thiosemicarbazide Camphene Derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. *Molecules* 2009. **14**: 1796-1807.
19. Cunha AP, Silva AP, Roque OR, Cunha E. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.
20. Lin TC. Study on the tannins and related compounds in the fruit of *Terminalia catappa* L. *Journal Chin. Pharm. Res* 1992. **14**:165-174.
21. Lu J; Wei Y, Yuan Q. Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography B* 2007. **857**:175-179.
22. Seeram N, Lee R, Hardy M, Heber D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* 2005. **41**: 49-55.
23. Doig AJ, Williams DH, Oelrichs PB, Baczynsky JL, Isolation and structure elucidation of punicalagin, a toxic hydrolysable tannin, from *Terminalia oblonga*. *J Chem. Soc. Perkin Trans* 1990. **673**: 2317-2321.
24. Apisariyakul A, Vanittanakon N, Buddhasukh D. Antifungal activity or turmeric oil from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 1995. **49**: 163-169.
25. Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Algurashi AM, Aldossary. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. **101**: 116-119.
26. Svetaz L, Zuljan F, Derita M. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010. **127**: 137-158.
27. Gurgel LA, Sidrim JJ, Martins DT, Cechinel Filho V, Rao VS. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophyte. *Journal of Ethnopharmacology* 2005. **97**:409-412.

28. Koroish AM, Foss SR, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnelli* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* 2008. **117**: 270-277.
29. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991. **28**:27-38.
30. Santos SC, Mello JC. Taninos. *IN: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Universidade Estadual de Santa Catarina. p. 517-544, 1999.*
31. Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM. In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of Punicalagin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**: 1491-1500.
32. Vidal A, Fallarero A, Peña BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela PM. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2003. **89**: 295-300.
33. Cerda B, Cerón JJ, Tomás-Barberá T, Espín JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J. Agric. Food Chem* 2003. **51**: 3493-3501.