



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

FRANCISCO LÉO NASCIMENTO DE AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE
PRODUTOS DE PLANTAS EM CEPAS DE *Candida albicans* E
Microsporium canis ISOLADAS DE CÃES E GATOS: Um
destaque para *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp.**

FORTALEZA - CEARÁ

2010

FRANCISCO LÉO NASCIMENTO DE AGUIAR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE PRODUTOS DE
PLANTAS EM CEPAS DE *Candida albicans* E *Microsporium canis*
ISOLADAS DE CÃES E GATOS: Um destaque para *Moringa oleifera* e
Vernonia sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA - CEARÁ

2010

FRANCISCO LÉO NASCIMENTO DE AGUIAR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE PRODUTOS DE
PLANTAS EM CEPAS DE *Candida albicans* E *Microsporum canis* ISOLADAS
DE CÃES E GATOS: Um destaque para *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Profa. Dra. Nilza Dutra Alves
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Examinadora

Profa. Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos Santos
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

A Deus, supremo criador e perdoador dos meus pecados.

A minha família sustentáculo para o meu equilíbrio.

A minha amada esposa Luzelena meu complemento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado ao longo desta caminhada, por sua fidelidade, fortaleza, por ser o autor e consumidor da minha fé.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa obtida.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade da realização de toda a pesquisa, bem como dos experimentos ao longo do mestrado.

Ao Professor Marcos Fábio Gadelha Rocha pela compreensão e solidariedade em momentos difíceis, pelas exortações em momentos de correção e de incentivo, por sua sabedoria na condução de minha orientação e na amizade construída ao longo da minha formação na Graduação bem como na Pós- Graduação.

A Professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelo apoio, pelos conselhos, atenção e incentivos, além do seu exemplo como profissional, que muito me inspiraram durante o mestrado.

Ao Professor José Júlio Costa Sidrim, por sua dedicação ao Centro Especializado em Micologia Médica, fazendo do mesmo, base para realização deste trabalho e de muitos outros, sendo uma referência como pesquisador.

A Professora Rossana Aguiar Cordeiro, co-orientadora desta dissertação, por seus sábios conselhos, sagacidade e visão, as quais colaboraram na percepção da disciplina na qual a pesquisa requer.

A Dra Nilza Dutra Alves, por gentilmente compor parte de minha banca examinadora, colaborando para fazer deste um trabalho melhor através de suas preciosas críticas e sugestões.

A Dra Lúcia de Fátima Lopes dos Santos pela amizade e incentivo que foram primordiais na minha caminhada acadêmica, desde a iniciação científica na Graduação até a Pós- Graduação. Sendo um referencial para a minha formação profissional e como ser humano.

A Dra. Ana Karoline Freire, amiga, pelas contribuições na minha qualificação e dissertação, bem como ao longo da pesquisa junto ao CEMM.

Ao Carlos Eduardo Cordeiro pela amizade, apoio, empenho prático e intelectual para realização deste trabalho.

A Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, pela sua colaboração, disposição em ajudar na execução deste projeto, seja prática ou intelectual.

Ao Manoel Paiva de Araújo Neto, pelo apoio, auxílio durante esta caminhada, amizade e incentivo na pesquisa.

A toda a equipe técnica do CEMM Terezinha de Jesus, ao Daniel Teixeira Lima, à Monalisa Cunha, Eliane, Wagna, pela amizade por toda a colaboração e o suporte proporcionado para a realização desta e muitas outras pesquisas.

A minha amada esposa pelo amor incondicional dedicado a mim, pela sua companhia, compreensão e ajuda ao longo de todo este trabalho, pelo seu suporte material e afetivo.

A minha mãe Tereza Nascimento de Aguiar, a quem devo muito de minha formação e caráter, pelo seu amor.

Ao meu irmão, Thiago Nascimento de Aguiar pela amizade e carinho.

Ao meu pai Roberto Vasconcelos de Aguiar (*in memoriam*) a quem hoje compreendo muito melhor, por seu amor e suporte na minha formação.

RESUMO

Nos últimos anos, o aumento da incidência das infecções fúngicas, bem como o registro crescente de resistência e falha terapêutica tem impulsionado a realização de estudos de prospecção de fitoquímicos com propriedades antifúngicas. Diante do exposto, o presente estudo investigou o potencial antifúngico de extratos de *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliensis*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum*. Inicialmente, realizou-se uma avaliação qualitativa da atividade antifúngica de cada amostra por meio do método de difusão em ágar, frente a cepas de *Candida albicans* e *Microsporum canis*. O *screening* inicial mostrou que apenas os extratos de *M. oleifera* (MLF-C) e *Vernonia* sp. (TVS-H) mostraram atividade frente a *C. albicans* e *M. canis*, com halos de inibição ≥ 10 mm. Os demais produtos testados não apresentaram atividade antifúngica satisfatória (halo de inibição ≥ 10 mm contra ambas as espécies fúngicas). Nos experimentos subseqüentes, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a toxicidade aguda de MLF-C e TVS-H, através de protocolos do CLSI e ensaio com *Artemia salina*, respectivamente. A determinação da CIM foi realizada frente a 12 cepas de *C. albicans* e *M. canis*, por meio do método de microdiluição em caldo e bioensaio com *Artemia salina*, respectivamente. A CIM (80%) de TVS-H e MLF-C frente *C. albicans* variou de 0,156 a 2,5 mg/mL; enquanto em cepas de *M. canis* foi de 0,039 a 0,625 e 0,039 a 1,25 mg/mL, respectivamente. A CIM (100%) de TVS-H e MLF-C frente *C. albicans* variou de 0,625 a $> 2,5$ mg/mL; enquanto em cepas de *M. canis* foi de 0,078 a 1,25 e 0,039 a 2,5 mg/mL, respectivamente. As doses letais (DL_{50}) para o MLF-C e TVS-H foram de 201.09 and 204.17 mg/mL, respectivamente. Conclui-se assim que os extratos de *M. oleifera* e *Vernonia* sp. apresentaram atividade antifúngica frente cepas de *C. albicans* e *M. canis*, abrindo a perspectiva de estudos para caracterização dos seus componentes bioativos.

Palavras-Chaves: Plantas. *Screening*. Atividade antifúngica. Toxicidade. *Moringa oleifera*. *Vernonia* sp.

ABSTRACT

Considering the narrow arsenal of antifungal drugs, along with the occurrence of resistance phenomenon in fungi, plant derivatives should be evaluated for their antifungal potential. Based on this, this work initially screened extracts of the plants *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliana*, even as the essential oils *Lippia alba* (Chemotypes 1, 2, 3 and 4) and *Ocimum gratissimum*. Initially, a qualitative evaluation of these products was performed through agar diffusion against strains of *Candida albicans* and *Microsporum canis*. In this screening, only *M. oleifera* (MLF-C) and *Vernonia* sp. (TVS-H) extracts presented antifungal activity against *C. albicans* and *M. canis*, with inhibition halo ≥ 10 mm. The other tested products did not present satisfactory antifungal activity (inhibition halo ≥ 10 mm for both fungal species). In the subsequent experiments, the minimum inhibitory concentration (MIC) and acute toxicity of MLF-C and TVS-H were determined by CLSI protocols and using assay of *Artemia salina*, respectively. The determination of MICs was performed against 12 strains of *C. albicans* and *M. canis*, through broth microdilution method, as standardized by CLSI (M27-A2 and M38-A). Additionally, acute toxicity assays of these extracts against *Artemia salina* were performed and the lethal concentration (LC50) was determined. MIC 80% for TVS-H and MLF-C against *C. albicans* varied from 0.156 to 2.5 mg/mL, while against *M. canis* it was from 0.039 to 0.625 and 0.039 to 1.25 mg/mL, respectively. The MIC 100% for TVS-H and MLF-C against *C. albicans* varied from 0.625 to > 2.5 mg/mL, while against *M. canis* it was from 0,078 a 1,25 e 0,039 a 2,5 mg/mL, respectively. Lethal Dose (LD₅₀) for MLF-C and TVS-H were 201.09 and 204.17 mg/mL, respectively. It can be concluded that *M. oilifera* and *Vernonia* sp. extracts presented antifungal activity against strains of *C. albicans* and *M. canis*, thus, providing perspectives for further studies to characterize their bioactive components.

Keywords: Plants. Screening. Antifungal activity. Toxicity. *Moringa oleifera*. *Vernonia* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia de <i>Vernonia</i> sp. em seu local de coleta.....	21
Figura 2	A. Fotografias de <i>Moringa oleifera</i> em seu local de coleta. B. Destaque para as flores.....	24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Atividade antifúngica de extratos TVS-H e MLF-C na concentração de 10mg/mL frente a *C. albicans* e *M. canis* através do método de difusão em ágar..... **49**
- Tabela 2.** Concentração inibitória mínima dos extratos brutos de TVS-H (*Vernonia* sp.) MLF-C (*Moriga oilifera*) frente *C. albicans* e *M. canis* por meio do método de microdiluição em caldo..... **50**

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL50	Concentração Letal frente 50 % das espécies avaliadas
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EAC	Escola de Agricultura do Ceará
MLF-C	Extrato das flores de <i>Moringa oleifera</i> (Lam.)
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
TVS-H	Extratos a partir dos talos de <i>Vernonia</i> sp.
UFC/mL⁻¹	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DERMATÓFITOS	15
2.2	LEVEDURAS	16
2.3	PLANTAS MEDICINAIS	18
2.3.1	Importância das Plantas Mediciniais	18
2.3.2	<i>Vernonia sp.</i>	19
2.3.3	<i>Moringa oleifera Lam.</i>	22
3	JUSTIFICATIVA	27
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	28
5	OBJETIVOS	29
5.1	OBJETIVO GERAL	29
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
6	CAPÍTULO I	31
7	CONCLUSÕES	51
8	PERSPECTIVAS	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento crescente na frequência de infecções fúngicas devido ao aumento de indivíduos com comprometimento do sistema imunológico, tais como: pacientes transplantados, acometidos por câncer, infetados com o HIV, dentre outros (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Nos animais domésticos, as dermatofitoses, consideradas como micoses superficiais, possuem grande interesse por seu potencial zoonótico. No meio rural, 80% das infecções fúngicas em humanos, em pele glabra, devem ser de origem animal, sendo no meio urbano, responsável por 20% das infecções, devido ao contato próximo com animais de estimação, como cães e gatos (GARCIA; BLANCO, 2000). O *Microsporum canis* é o responsável pela maioria de casos de micoses em animais de estimação e o mais frequente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas (CABAÑES, 2000; BRILHANTE et al., 2002). Vários pesquisadores têm demonstrado a importância epidemiológica dos animais nas dermatofitoses. Dentre os animais domésticos, o gato é o principal disseminador do *M. canis* (BENTUBO et al., 2006).

Quanto às micoses causadas por leveduras em animais domésticos, os fungos do gênero *Candida* têm se destacado (BRITO et al., 2008). As *Candida* spp., em decorrência de distúrbios nas proteções física, química e imunológica de seres humanos e animais, portadores naturais, podem se tornar patógenos e causar enfermidades, denominadas candidoses (FONZI, 2008).

As doenças fúngicas, que ocorrem com relativa frequência na clínica, tanto humana como veterinária, apresentam uma problemática relacionada ao tratamento principalmente de casos crônicos, que pode ser explicada devido a baixo número de substâncias dentro do arsenal terapêutico quando comparado com drogas antibacterianas, bem como efeitos colaterais e seleção de cepas resistentes (SIDRIM; ROCHA, 2004). Ademais, o crescente relato de refratariedade e /ou resistência à terapêutica disponível, impulsionam a realização de estudos para avaliação da resistência fúngica emergente. Embora esse tema ainda seja incipiente em Medicina Veterinária, o relato de cepas fúngicas

oriundas de cães exibindo resistência primária *in vitro* a drogas de uso clínico, desperta atenção para o assunto (BRITO 2007; BRITO et al., 2008). Esta realidade tem suscitado a execução de estudos em busca de novas alternativas terapêuticas para o controle das micoses (FONTENELLE et al., 2007; FONTENELLE et al., 2005).

Emerge deste cenário o estudo de plantas como fonte de substâncias bioativas, as quais podem subsidiar novos compostos na terapêutica fúngica, principalmente quando falamos de infecções sistêmicas, as quais apresentam uma carência de princípios ativos quando comparada com a terapêutica antibacteriana (RUKAYADI et al., 2008; ALVES et al., 2006).

Nesta perspectiva o gênero *Vernonia* sp., apresenta grande importância medicinal, pelo fato de possuir mais de 20 espécies com propriedades terapêuticas descritas, principalmente no sistema etno-medicinal americano (OLIVEIRA, 2008). Com relação à atividade antimicrobiana, são reportados na literatura espécies de *Vernonia* apresentando tal eficácia. Kunle et al. (2010) demonstrou que o extrato metanólico bruto das partes altas de *Vernonia ambigua* apresentando atividade antimicrobiana.

A moringa, *Moringa oleifera* L., é uma planta tropical pertencente à família *Moringaceae*, nativa da Índia que foi introduzida no Brasil por volta de 1950. É encontrada na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará. Com relação a sua atividade antimicrobiana, pesquisas recentes tem descrito sua eficácia frente bactérias bem como fungos (CHUANG et al., 2007; JABEEN et al., 2008; RAHMAN et al., 2009), apontando a mesma como importante fonte de compostos bioativos de eficácia antimicrobiana.

Baseado no exposto, esta pesquisa investigará a possível atividade antifúngica dos extratos das espécies *Moringa oleifera* (MLF-C), *Vernonia* sp. (TVS-H), *Licania rigida* Benth., *Croton jacobinensis* Bail., *Vernonia brasiliana* (L.) Druce., *Baccharis ligustrina* DC., *Baccharis schultzei* Baker., e dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum* L. em cepas de *M. canis* e *C. albicans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DERMATÓFITOS

O estudo das dermatofitoses começou juntamente com a história da Micologia Médica em 1839 com Robert Remak, que elucidou a etiologia do *favus*. Quase um século depois os dermatófitos foram classificados taxonomicamente pelo dermatologista francês Raymond Jacques Andrien Sabouraud. Hoje existe uma infinidade de fungos pertencentes aos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*; entretanto, a denominação dermatófito é utilizada somente para os fungos pertencentes a esses gêneros e que são queratinofílicos e capazes de causar doenças em humanos e animais (SIDRIM; ROCHA, 2004). Dentre as infecções fúngicas, as micoses superficiais têm sido consideradas preocupantes para os veterinários. Nos animais domésticos, as dermatofitoses, consideradas como micoses superficiais, possuem grande interesse pelo seu potencial zoonótico (BIANCALANA et al., 2008).

A dermatofitose é uma doença fúngica cutânea de caráter contagioso, causada por um grupo de fungos patogênicos chamados dermatófitos. Tem como agentes etiológicos as espécies de *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp. e *Epidermophyton* sp., que infectam várias espécies animais, determinando de modo geral, lesões secas, arredondadas e, comumente, não pruriginosas que se distribuem nos tecidos queratinizados da pele (camada celular córnea da epiderme, pêlos e potencialmente as unhas, cascos e chifres), levando à autólise das estruturas fibrosas, à fragmentação dos pêlos e à alopecia (AVANTE et al., 2009). A infecção pode ocorrer em qualquer idade, embora os jovens sejam mais comumente afetados que os idosos, assim como pacientes com imunossupressão ou debilitados (BRASCH, 2009).

Algumas espécies de dermatófitos vivem no solo e ocasionalmente infectam o homem; são denominadas espécies geofílicas. As espécies zoofílicas parasitam animais e raramente o homem, enquanto as espécies antropofílicas parasitam preferencialmente o homem. A distribuição da biota dermatofítica é variável, tanto de região como no decorrer do tempo. É influenciada por fatores

como variações climáticas, aspectos socioeconômicos, modo de vida, presença de animais domésticos e idade. O contágio pode ser feito por contato direto com seres humanos, animais ou solo contaminado, ou indiretamente, por exposição à fomites contaminados. A colonização começa na camada córnea da pele, pelo ou unha, e sua progressão depende de vários fatores inerentes ao dermatófito ou ao hospedeiro. As dermatofitoses apresentam variantes clínicas denominadas conforme a topografia do acometimento: tinha do couro cabeludo, tinha da barba, tinha do corpo, tinha inguinocrural, tinha da unha, tinha do pé, tinha da mão e tinha imbrincada. Existe ainda a doença alérgica chamada de dermatofítide (ZAITZ, 2010).

O *M. canis* é o responsável pela maioria de casos de micoses em animais de estimação e o mais freqüente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas (CABAÑES, 2000; BRILHANTE et al., 2002). As enfermidades micóticas têm importância distinta dentro das enfermidades veterinárias devido ao seu potencial zoonótico. Vários pesquisadores têm demonstrado a importância epidemiológica dos animais nas dermatofitoses. Dentre os animais domésticos o gato é o principal disseminador do *M. canis* (GURTLER et al., 2005). O *M. canis* é cosmopolita, endêmico em criações de felinos, onde todos os animais jovens podem estar clinicamente afetados e em contraste, os adultos portadores podem não apresentar lesões. Porém existe forte correlação quando os proprietários são portadores de dermatofitose, e a presença de *M. canis* em isolados de cães e gatos assintomáticos (CARFACHIA et al., 2006).

2.2 LEVEDURAS

A história natural das doenças causadas por leveduras pode ser melhor compreendida à luz da susceptibilidade do hospedeiro. O indivíduo sadio apresenta mecanismos de defesa inespecíficos e específicos, tais como; barreiras anatômicas e fisiológicas, resposta inflamatória e resposta imunológica, que, juntos, representam obstáculo ao estabelecimento da infecção fúngica (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A candidose é a mais frequente infecção fúngica oportunista. O termo candidose ou candidíase tem conotação genérica, sendo utilizado para denominar o conjunto de doenças causadas por *C. albicans*, assim como por outras espécies de leveduras relacionadas (SPETH et al., 2008).

A espécie *C. albicans* apesar de fazer parte da microbiota normal do trato intestinal, pode se constituir um patógeno oportunista das regiões mucocutâneas, trato digestivo e genital de mamíferos e aves, além de envolver pele, unhas e trato respiratório com riscos de desencadear fungemias. A candidose como doença primária é extremamente rara, e via de regra, está associada a neoplasias, doenças imunomediadas e ao uso prolongado de corticosteroides, antimicrobianos ou citostáticos (SPETH et al., 2008).

Diversos são os relatos de cepas de *Candida* isoladas de humanos e animais resistentes *in vivo* e *in vitro* a fármacos antifúngicos, principalmente a derivados azólicos, e dentre estes, ao fluconazol, sendo as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* as mais citadas (SANGLARD; ODSS, 2002; POSTERARO et al., 2006; KALKANCI et al., 2007; BRITO et al., 2009; SIDRIM et al., 2010). Nos últimos anos, cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, oriundas de animais, apresentaram resistência, *in vitro*, a fluconazol, cetoconazol e itraconazol (OZAWA et al., 2001; BRITO et al., 2009; SIDRIM et al., 2010).

Diversas são as causas descritas para o fenômeno da resistência apresentada por cepas de *Candida* spp., tais como: pontos de mutação em genes, redução da permeabilidade da membrana, exposição contínua a antifúngicos, entre outras (PEREA et al., 2002; SANGLARD; ODSS, 2002; CHONG et al., 2007).

O desenvolvimento de resistência aos derivados azólicos pode também decorrer da exposição prolongada da cepa fúngica a este grupo de drogas, fato já observado em cepas de *C. albicans* e comum em pacientes portadores de HIV. Comumente tais pacientes apresentam candidíase orofaríngea e são tratados com fluconazol oral, que, apesar de eficiente e pouco tóxico, comumente acarreta aumento da frequência de resistência clínica, levando a infecção por cepas resistentes a este fármaco (MARTINEZ et al., 2009). A resistência clínica pode

ocorrer por variados mecanismos, tais, como: infecção por microrganismo que apresenta resistência intrínseca; seleção de cepas resistentes, oriundas da pressão exercida pelo antifúngico; e desenvolvimento de resistência no microrganismo anteriormente sensível (BRITO et al., 2009).

2.3 PLANTAS MEDICINAIS

2.3.1 Importância das Plantas Medicinais

O fornecimento de substâncias de origem vegetal com aplicação no tratamento de doenças tem sido de grande interesse na medicina tradicional. Documentos históricos, tais como a *Tabuinha sumeriana*, fragmentos do *Papyrus Ebers*, *Matéria Médica* e *El libro de medicina interna Del Emperador Amarillo*, mostram a relação do homem com as plantas, demonstrando o interesse do homem no uso destas para o tratamento de suas enfermidades. Foi por meio do tratamento com as plantas medicinais que surgiu a Fitoterapia, cuja origem grega (*phito* = planta e *terapias* = tratamento) se caracteriza como a terapêutica por meio de plantas frescas, secas e seus preparados (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Até meados do século XIX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando do surgimento da síntese química, a qual ganhou espaço na confecção dos medicamentos. Porém este processo passou por uma reversão no final do século XX, iniciando-se assim uma nova fase de desenvolvimento vertiginoso da pesquisa de fitoterápicos. Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese (CALIXTO, 2000). Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, oriundos de nada mais do que 90 espécies, na utilização na terapia moderna. No entanto, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são, quase que na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China, Coréia e Japão, sendo que a contribuição dos outros países é bem menor. Existem na Terra aproximadamente entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas, mas grande parte

das plantas ainda não tem estudos químicos, analíticos e farmacológicos. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal (SOEJARTO, 1996) e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (FERNANDES, 2004).

No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos. As fábricas brasileiras passaram por um processo, em sua maioria, de desativação ou foram substituídas por multinacionais. Assim, o uso de plantas medicinais passou a ser negligenciado - até algumas décadas atrás, quando os produtos naturais foram recuperados e a sua utilização voltou a ser pesquisada (FERNANDES, 2004). Apesar do aumento nos últimos anos dos estudos sobre plantas medicinais, menos de 25% destas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Considerando a grande biodiversidade da flora brasileira, esse número poderia ser bem maior (RABELO, 2003; VALGAS 2002).

2.3.2 *Vernonia* sp.

O gênero *Vernonia* pertence à família Asteraceae, responsável por cerca de 10% da flora mundial, possuindo distribuição cosmopolita não ocorrendo em regiões temperadas e frias de ambos os hemisférios, apresentando muitas vezes espécies com um endemismo pronunciado para uma dada localidade (OLIVEIRA, 2008). No Brasil a família está distribuída em 250 gêneros e 2000 espécies, sendo subdividida, segundo Judd et al. (2008), em 17 tribos. A tribo Vernonieae é representada por 1300 espécies, das quais 100 são representantes do gênero *Vernonia*, sendo este o núcleo central da tribo. Este gênero (Figura 1) é representado por ervas, arbustos ou árvores, com folhas quase sempre alternas;

seus capítulos podem ser solitários, em panículas, corimbos, cimas, escorpioides ou tirsóides. Suas folhas podem ser brancas, rosas, violetas, vermelhas, azuis ou roxas, nunca sendo amarelas; as cípselas podem ser angulosas ou costadas, glabras ou seríceas; o papus é quase sempre duplo com uma fileira externa de cerdas curtas e a fileira interna com muitas cerdas plumosas, barbeladas ou escabrosas, persistentes ou não (RIVERA, 2006). *Vernonia* é um dos gêneros de maior complexidade taxonômica na família Asteraceae. Esta complexidade é gerada principalmente pela extrema diversidade de formas biológicas que o gênero exibe, desde pequenas ervas rosuladas até grandes árvores (OLIVEIRA, 2008).

O gênero *Vernonia* apresenta uma grande importância econômica, por possuir propriedades medicinais já documentadas, principalmente curativas, bem como algumas espécies são produtoras de óleos essenciais e fornecem mel de boa qualidade, sendo procuradas pelas abelhas, tanto pelo néctar como pelo pólen (BARTH et al., 2005). No continente africano, muitas espécies de *Vernonia* são utilizadas medicinalmente para o tratamento de malária, infecções e amebíase (TONA et al., 2004).



(Fonte: Laboratório de Química Orgânica – UFC, 2009).

Figura 1 - Fotografia de *Vernonia* sp. em seu local de coleta. Número da excisata: 46091 do Herbário Prisco Bezerra, Escola de Agronomia do Ceará. Foto cedida pelo prof. Francisco Geraldo Barbosa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

No Brasil, as folhas das plantas deste gênero são empregadas na medicina popular principalmente em casos de gripe, tosses, bronquite, contusões, hemorroidas e infecções do útero (CORRÊA et al., 2004).

Dentre as espécies que possuem ação comprovada cientificamente, destacamos, *V. cinerea* (L.) Less., com atividade analgésica, anti-inflamatória, antipirética e ação citotóxica (IWALEWA et al., 2003). *Vernonia herbácea* (Vell.) Rusby, possui um sistema subterrâneo rico em frutanos do tipo inulina que, por hidrólise enzimática, podem constituir alternativa para a produção comercial de frutose (PESSONI et al., 2004).

As folhas de *V. polyanthes* Less., são utilizadas no tratamento de afecções do aparelho respiratório, de problemas renais, de feridas e em torções, contusões e luxações. A espécie ainda é indicada como tônica e diurética. Com relação à atividade antifúngica, o extrato da raiz de *Vernonia scorpioides*, apresentou atividade antibiótica frente *Penicillium citrinum* (FREIRE; ABREU, 1996). Em estudo utilizando a técnica de difusão em disco, os óleos essenciais de *V. brasiliiana* e *V. remotiflora* apresentaram atividade antimicrobiana frente bactérias Gram-negativas (MAIA et al., 2010).

Dentre os compostos bioativos, que foram isolados deste gênero, após screening fitoquímico, podemos destacar a presença de saponinas, taninos, alcaloides e flavonoides. Lactonas sesquiterpênicas com propriedades anticâncer e antiespasmódica, glicosídeos esteroidais com atividade anti-inflamatória e sesquiterpenóides citotóxicos (MAIA et al., 2010).

2.3.3 *Moringa oleifera* Lam.

O gênero *Moringa* é possuidor de 14 espécies arbóreas e arbustivas, destacando-se a espécie *M. oleifera* (Figura 2), que é uma árvore nativa da Índia, na região Norte, sendo hoje cultivada ao longo dos trópicos. É conhecida como “drumstick” ou “bastão de tambor” devido ao formato de seus frutos, e por causa do formato de sua vagem; “Rabanete picante”, por conta do gosto de suas raízes. Seu crescimento se dá rapidamente, seja a partir de suas sementes ou de enxertos, não sendo muito exigente com relação ao solo. Cresce bem sem grandes cuidados e sobrevive a longos períodos de estiagem. Produz flores e frutos dentro de um ano de plantio, crescendo rapidamente até quatro metros de altura. (BEZERRA et al., 2004).

No Brasil, amostras são encontradas na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará, onde foi introduzida por volta de 1950. Tem como principais características botânicas, ser uma árvore de grande porte, com folhas bipinadas, com sete folíolos pequenos em cada pina. Apresenta um tronco único, de pequeno porte, sendo bem menor no Brasil do que na Índia. Possui caule delgado (até 10 cm), muitas vezes único, e copa aberta, em forma de sombrinha. O seu crescimento é bastante rápido (1,5 cm por dia), podendo a planta atingir cerca de doze metros de altura, desenvolvendo-se bem em regiões quentes, semi-áridas e úmidas e em terras arenosas ou argilosas bem drenadas. Apresenta em sua casca látex. Em sua medula central, há uma grande quantidade de mucilagem, rica em arabinose, galactose e ácido glucurônico. Suas folhas são verdes pálidas, decíduas alternadas, pecioladas e compostas, podendo, ou não apresentar estipula, mucilagem epidérmica, estômatos ou pelos. Os folíolos laterais possuem formas elípticas enquanto que os terminais são ligeiramente

maiores que os laterais. Possuem em seus mesófilos, cristais de cálcio. (CYSNE, 2006).

As flores são diclamídeas, ou seja, o perianto dividiu-se em cálice e corola. São ainda monoclinas, perfumadas, de cores creme ou branca, estando agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa, as chamadas panículas. Em lugares onde o índice pluviométrico é maior do que seiscentos milímetros por ano, as árvores estão sempre floridas; caso contrário, a planta só se reproduz na estação chuvosa. O androceu apresenta estaminoides e estames. O gineceu é sincárpico, tricarpelar, gamocarpelar, uniloculado, plúrioovulado, com ovário súpero, e apresenta placentação parietal. Os frutos são vagens, possuindo uma cor verde a marrom esverdeado, formato triangular e se quebra longitudinalmente em três partes quando seco, sendo deiscente, é uma cápsula, tem aproximadamente trinta a cento e vinte centímetros de comprimento e 1,8 centímetros de espessura. As vagens contêm de 10 a 20 sementes armazenadas em um polpa branca. As sementes globóides, são escuras por fora e contêm no seu interior uma massa branca e oleosa. O núcleo é encoberto por uma concha sendo trialadas, oleaginosas, e medindo até um cm de diâmetro. A raiz assemelha-se na aparência e no sabor ao rabanete. A casca da raiz é espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara, externamente, e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelo. Tem odor pungente e sabor semelhante ao do rabanete (CYSNE, 2006).

No nordeste brasileiro, inclusive no Ceará, onde é cultivada como planta ornamental e medicinal, é conhecida como lírio-branco, quiabo de quina ou simplesmente moringa (MATOS, 1998).



(Fonte: Laboratório de Química Orgânica – UFC, 2009)

Figura 2 – A. Fotografias de *Moringa oleifera* em seu local de coleta. Número da excicata: 47374 do Herbário Prisco Bezerra, Escola de Agronomia do Ceará. **B.** Destaque para as flores. Fonte: Foto cedida pelo prof. Francisco Geraldo Barbosa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

Pode ser explorada, tanto em condições irrigadas como de sequeiro, apresentando um grande potencial em face de sua multiplicidade de usos (LORENZI; MATOS, 2002) sendo referida como ‘árvore milagrosa’ (FUGLIE, 1999). Quase todas as partes da planta são consumidas sendo as sementes conhecidas como um tipo de amendoim em Malawi. Em outros lugares do mundo as árvores da moringa são apreciadas pelos camponeses pela qualidade de suas vagens e folhas. As folhas são especialmente, ricas em vitaminas, minerais e proteínas constituindo assim um alimento de grande valor nutricional (FAHEY, 2005). As folhas têm um alto conteúdo de proteína (27%) e são ricas em vitamina A e C, cálcio, ferro e fósforo, podendo ser usadas na alimentação humana ou animal. Uma vantagem é que as folhas da moringa podem ser colhidas durante a estação seca. A cultura da moringa é de grande importância comercial em toda a

Índia. No sul, muitas variedades foram desenvolvidas com diferentes comprimentos de vagem e períodos de crescimento. As vagens são vendidas nos mercados locais. Já as raízes e outras partes da planta são utilizadas na medicina tradicional. Vagens verdes são cortadas em seções e enlatadas em salmoura para exportação para a Europa e Estados Unidos (JAHN et al., 1986). O óleo contido nas sementes tem alto valor alimentício e industrial. É conhecido como ‘Ben Oil’ sendo claro, doce, inodoro e resistente a rancificação; por conseguinte é comestível e útil na fabricação de cosméticos. As sementes da moringa contêm 38% de seu peso em óleo que é constituído de glicerídeos dos ácidos oléico (63,4%), linoleico (3,1%), palmítico (8,3%) e esteárico (8,0%) (DAHOT, 1998). Testes laboratoriais em Leicester confirmaram que o que resta das sementes após a extração do óleo, contém ainda coagulantes ativos. Estes restos podem ser usados para o tratamento de água sendo obtidos sem nenhum custo como subproduto da extração do óleo (EILERT et al., 1981). Um ponto importante é que as sementes da moringa podem primeiro ser usadas para a extração de óleo, sem reduzir a eficácia no tratamento da água. O óleo da moringa é de alta qualidade e potencialmente tem alto valor no mercado. Tem valor, tanto para a cozinha como para ingrediente principal na produção de sabão. A demanda por óleo no Malawi é muito maior do que a produção atual dentro do país, necessitando da importação do óleo de soja da América do Sul (EILERT et al., 1981).

De acordo com Jahn et al. (1986), as sementes de moringa possuem polissacarídeos com forte poder aglutinante, o que permite o uso das sementes pulverizadas no tratamento da água por floculação e sedimentação, capaz de eliminar a turvação, micro-partículas, fungos, bactérias e vírus. O uso de sementes trituradas de moringa para purificação da água a um custo de uma pequena fração do tratamento químico convencional é uma tentativa da mais alta importância. Isto possibilitaria a substituição de agentes coagulantes usados atualmente (sulfato de alumínio, por exemplo), muitas vezes prejudiciais à saúde humana e animal. Num projeto piloto para tratamento de água em Malawi, na África, foi constatado que, enquanto o alumínio é eficiente como coagulante em

uma faixa restrita de pH da água, as sementes de moringa atuam independentemente do pH, constituindo numa vantagem adicional em regiões mais pobres, onde normalmente não é possível controlar efetivamente o pH antes da coagulação (OKUDA et al., 2001). Segundo Folkard et al. (1993), para a purificação da água, coloca-se o pó da semente sobre a superfície da água na proporção de 0,2 g/litro, mistura-se bem e, após um dia, a água estará pronta para uso doméstico podendo ser este tipo de tratamento da água muito útil no controle dos surtos diarréicos, inclusive da cólera, especialmente nas áreas onde outras medidas sanitárias são dificilmente aplicáveis.

Contém um princípio dotado de atividade antimicrobiana, a pterigospermina, bem como os glicosídeos moringina, 4-(α -L-ramnosilori)-isotiocianato de benzila e 4-(α -L-ramnosilori)-fenil-acetonitrila. Estes componentes oriundos das folhas, mostraram atividade antimicrobiana principalmente contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phei*, *Serratia marcescens* e ainda, sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* e *Streptococcus* (CYSNE, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se o estreito arsenal de drogas antifúngicas, aliado ao fato do surgimento do fenômeno de resistência em fungos, faz-se necessário uma bioprospecção de produtos naturais, especialmente derivados de plantas, com potencialidade antifúngica.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os extratos das plantas *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliensis*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum*, apresentam atividade antifúngica frente *C. albicans* e *M. canis*, *in vitro*.

5 OBJETIVOS:

5.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um *screening* de plantas com potencialidade antifúngica frente a cepas de *C. albicans* e *M. canis*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Averiguar a atividade antifúngica de extratos das plantas *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliana*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum*, frente *C. albicans*, através do método de difusão em ágar;

2- Averiguar a atividade antifúngica de extratos das plantas *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliana*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum*, frente *M. canis*, através do método de difusão em ágar;

3- Determinar através do método de microdiluição em caldo, a concentração inibitória mínima dos produtos das plantas que apresentaram atividade positiva no *screening* inicial;

4- Averiguar a toxicidade aguda dos produtos das plantas que apresentaram atividade antifúngica, através da determinação da CL50 no modelo experimental de *Artemia salina*.

6 CAPÍTULO I

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

**Bioprospecção de Plantas com Potencialidade Antifúngica em Cepas de
Candida albicans e *Microsporium canis* Isoladas de Cães e Gatos: Um
Destaque para *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp.**

Rocha, M. F. G.^{I, II}; Aguiar, F. L. N.^I; Brilhante, R. S. N.^{II*}; Cordeiro, R.A.^{II};
Teixeira, C. E. C.^{II}; Castelo-Branco, D. S. C. M.^{II}; Paiva, M.A.N.^I; Zeferino,
J.P.O.^I; Mafezoli, J.^{III}; Barbosa, F.G.^{III}; Sidrim, J. J. C.^{II}

^I Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

^{II} Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Centro Especializado em Micologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

^{III} Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

***Corresponding author:** R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brasil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: brilhante@ufc.br.

Resumo

Nos últimos anos, o aumento da incidência das infecções fúngicas, bem como o registro crescente de resistência e falha terapêutica tem impulsionado a realização de estudos de prospecção de fitoquímicos com propriedades antifúngicas. Diante do exposto, o presente estudo investigou o potencial antifúngico de extratos de *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzii*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliensis*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum*. Inicialmente, realizou-se uma avaliação qualitativa da atividade antifúngica de cada amostra por meio do método de difusão em ágar, frente a cepas de *Candida albicans* e *Microsporium canis*. O *screening* inicial mostrou que apenas os extratos de *M. oleifera* (MLF-C) e *Vernonia* sp. (TVS-H) apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *M. canis*, com halos de inibição ≥ 10 mm. Os demais produtos testados não apresentaram atividade antifúngica satisfatória (halo de inibição ≥ 10 mm contra ambas as espécies fúngicas). Nos experimentos subseqüentes, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a toxicidade aguda de MLF-C e TVS-H, através de protocolos do CLSI e ensaio com *Artemia salina*, respectivamente. A determinação da CIM foi realizada frente a 12 cepas de *C. albicans* e *M. canis*, por meio do método de microdiluição em caldo e bioensaio com *Artemia salina*, respectivamente. A CIM (80%) de TVS-H e MLF-C frente *C. albicans* variou de 0,156 a 2,5 mg/mL; enquanto em cepas de *M. canis* foi de 0,039 a 0,625 e 0,039 a 1,25 mg/mL, respectivamente. A CIM (100%) de TVS-H e MLF-C frente *C. albicans* variou de 0,625 a $> 2,5$ mg/mL; enquanto em cepas de *M. canis* foi de 0,078 a 1,25 e 0,039 a 2,5 mg/mL, respectivamente. As concentrações letais (CL_{50}) para o MLF-C e TVS-H foram de 201.09 and 204.17 mg/mL, respectivamente. Concluiu-se assim que os extratos de *M. oilifera* e *Vernonia* sp. apresentaram atividade antifúngica frente cepas de *C. albicans* e *M. canis*, abrindo a perspectiva de estudos para caracterização dos seus componentes bioativos.

Palavras-Chaves: Plantas, *screening*, atividade antifúngica, toxicidade, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp.

Abstract

Considering the narrow arsenal of antifungal drugs, along with the occurrence of resistance phenomenon in fungi, plant derivatives should be evaluated for their antifungal potential. Based on this, this work initially screened extracts of the plants *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliensis*, as well as the essential oils of *Lippia alba* (Chemotypes 1, 2, 3 and 4) and *Ocimum gratissimum*. Initially, a qualitative evaluation of these products was performed through agar diffusion against strains of *Candida albicans* and *Microsporum canis*. In this screening, only *M. oleifera* (MLF-C) and *Vernonia* sp. (TVS-H) extracts presented antifungal activity against *C. albicans* and *M. canis*, with inhibition halo ≥ 10 mm. The other tested products did not present satisfactory antifungal activity (inhibition halo ≥ 10 mm for both fungal species). In the subsequent experiments, the minimum inhibitory concentration (MIC) and acute toxicity of MLF-C and TVS-H were determined by CLSI protocols and using assay of *Artemia salina*, respectively. The determination of MICs was performed against 12 strains of *C. albicans* and *M. canis*, through broth microdilution method, as standardized by CLSI (M27-A2 and M38-A). Additionally, acute toxicity assays of these extracts against *Artemia salina* were performed and the lethal concentration (LC50) was determined. MIC 80% for TVS-H and MLF-C against *C. albicans* varied from 0.156 to 2.5 mg/mL, while against *M. canis* it was from 0.039 to 0.625 and 0.039 to 1.25 mg/mL, respectively. The MIC 100% for TVS-H and MLF-C against *C. albicans* varied from 0.625 to > 2.5 mg/mL, while against *M. canis* it was from 0.078 a 1.25 e 0.039 a 2.5 mg/mL, respectively. Lethal Concentration (LC50) for MLF-C and TVS-H were 201.09 and 204.17 mg/mL, respectively. It can be concluded that *M. oleifera* and *Vernonia* sp. extracts presented antifungal activity against strains of *C. albicans* and *M. canis*, thus, providing perspectives for further studies to characterize their bioactive components.

Keywords: Plants, screening, antifungal activity, toxicity, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp.

Introdução

Com o aumento da frequência de infecções fúngicas em seres humanos, a realização de pesquisas visando suscitar novas alternativas terapêuticas frente fungos de importância médica-veterinária ganhou força. As plantas são tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no tratamento de doenças desde a antiguidade, sendo fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos, revelando nestes produtos alta diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químico-biológicas (Simões, 2007).

Nos animais domésticos, as dermatofitoses, consideradas como micoses superficiais, possuem grande interesse pelo seu potencial zoonótico. O *Microsporum canis* é o responsável pela maioria de casos de micoses em animais de estimação e o mais frequente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas, segundo Brilhante et al.(2003). Dentre os animais de companhia, o gato é o principal disseminador do *M. canis* por portá-lo muitas vezes de maneira assintomática (Cafarchia et al., 2006; Mendoza et al., 2010).

Quanto às micoses causadas por leveduras em animais domésticos, destacam-se os fungos do gênero *Candida* (Brito et al., 2007). As leveduras do gênero *Candida* podem tornar-se patógenas em decorrência de desequilíbrio nas proteções física, química e imunológica de seres humanos e animais, levando assim a enfermidades, denominadas candidoses, as quais requerem investimentos no tratamento, principalmente na sua forma sistêmica (Moran et al., 2010).

As doenças fúngicas, apresentam uma problemática relacionada ao tratamento principalmente de casos crônicos, que pode ser explicada devido a baixo número de substâncias dentro do arsenal terapêutico quando comparado com as drogas antibacterianas, bem como efeitos colaterais e seleção de cepas resistentes e/ou refratárias à terapêutica disponível (Kontoyiannis e Lewis, 2002). Esta realidade tem suscitado a execução de estudos em busca de novas alternativas terapêuticas para o controle das micoses.

Segundo Soejarto (1996), apesar do aumento dos estudos sobre plantas medicinais, somente 15 a 17% destas foram estudadas quanto ao seu potencial

medicinal. Considerando a grande biodiversidade da flora brasileira, esse número poderia ser bem maior (Rabelo, 2003; Valgas 2002). Emerge deste cenário o estudo de plantas como fonte de substâncias bioativas, as quais podem subsidiar novos compostos na terapêutica fúngica através da busca ativa, por meio da bioprospecção (Alves et al., 2006; Rukayadi et al., 2008).

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antifúngica de extratos e óleos essenciais das seguintes plantas usadas na medicina popular: *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliensis*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum* frente a cepas de *Candida albicans* e *Microsporum canis*.

Material e Métodos

- Amostras testadas

Os extratos de *Baccharis ligustrina*, *Baccharis schultzei*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *Vernonia brasiliensis*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum* foram preparados com base em trabalhos anteriores (Fontenelle et al., 2007; Fontenelle et al., 2008; Leite et al., 2009). Considerando que o *screening* inicial mostrou que apenas os extratos de *M. oleifera* (MLF-C) e *Vernonia* sp. (TVS-H) tiveram atividade frente a *C. albicans* e *M. canis*, ao longo deste trabalho, serão abordados somente estes dois produtos, com ênfase na preparação, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e toxicidade aguda.

- Preparação do extrato MFL - C a partir das flores de *Moringa oleifera* Lam.

As flores de *Moringa oleifera* foram coletadas a partir de espécimes cultivados em Fortaleza, Ceará. Depois de secas em estufa a 40 °C, as flores (50 g), foram submetidas a três extrações sucessivas por maceração a frio com

clorofórmio (1 L) em intervalos de 24 h. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo obteve-se 14,73 g do extrato, o qual foi denominado MFLC.

- Preparação do extrato TVS-H a partir dos talos de *Vernonia* sp.

Os talos de *Vernonia* sp., foram coletados na serra de São Miguel no município de Itapipoca-Ceará. Depois de secos em estufa a 40 °C, os talos (60,50 g), foram submetidas a três extrações sucessivas por maceração a frio com hexano (250 mL) em intervalos de 24 h. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo obteve-se 0,341 g do extrato, o qual foi denominado TVS-H. A torta resultante foi submetida a três extrações sucessivas por maceração a frio com etanol (250 mL) em intervalos de 24 h. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo obteve-se 1,31 g do extrato, o qual foi denominado TVS-E. Os extratos TVS-H e TVS-E foram submetidos a ensaios de atividade antifúngica *in vitro*, mas somente o extrato TVS-H se mostrou ativo.

- Cepas fúngicas

Neste estudo foram utilizadas cepas de *C. albicans* e *M. canis*, provenientes da Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) - Universidade Federal do Ceará, mantidas em ágar batata dextrose acrescido de DMSO à -20°C. Para a análise de viabilidade, as culturas foram descongeladas e repicadas em ágar batata dextrose, sendo incubadas a 28° C por 4 ou 10 dias, para *C. albicans* e *M. canis*, respectivamente. Foram selecionadas cepas de *C. albicans* (n=12) e *M. canis* (n=12) isoladas de cães e gatos saudáveis ou com dermatomicose.

- Preparação do inóculo para testes de sensibilidade antifúngica

O preparo do inóculo fúngico para os testes de difusão em ágar foi realizado conforme metodologias descritas por Gurgel et al. (2005) e Fontenelle et al. (2007), a partir de culturas de *C. albicans* e *M. canis* mantidas em ágar

batata dextrose a 28° C por 2 ou 7 dias, respectivamente. Após esse período, os cultivos fúngicos foram cobertos com 2 mL de salina estéril e, com auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície de cada cultura, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e, em seguida, deixadas em repouso a 28 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 530 nm e a sua transmitância ajustada para 95%, a fim de se obter inóculo de padronizado em aproximadamente 10^6 UFC/ml⁻¹ e 10^5 UFC/ml⁻¹ para *C. albicans* e *M. canis* respectivamente.

Para o teste de microdiluição, as suspensões de *C. albicans* a suspensão foram diluídas na proporção de 1:100 seguida de uma diluição 1:20 com RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponados em pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma Chemical Co.) para obtenção de inóculo final de $2,5 - 5 \times 10^3$ UFC mL⁻¹. As suspensões de *M. canis* foram diluídas na proporção 1:5 em caldo RPMI 1640 para obtenção de inóculo de 5×10^4 UFC ml⁻¹ (Fontenelle et al., 2007; Brilhante et al., 2004).

- Método de difusão em ágar

Os extratos de *Baccharis ligustrina*, *B. schultzii*, *Croton jacobinensis*, *Licania rigida*, *Moringa oleifera*, *Vernonia* sp., *V. brasiliana*, assim como os óleos essenciais de *Lippia alba* (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum* foram inicialmente testados contra as cepas de *C. albicans* (n=8) e *M. canis* (n=7), por meio do método de difusão em ágar (Fontenelle et al. 2007) Os extratos foram submetidos a teste para certificação da qualidade do extrato através da adição de 10 µl do extrato em 2 mL de BHI por 24 horas para observação de crescimento microbiano, o qual não foi observado em nenhuma das amostras. Em seguida, placas de Petri de 150 mm de diâmetro foram preparadas contendo 22 mL de ágar dextrose batata (Difco, Detroit, USA) e, em seguida, cada inóculo fúngico foi estriado na superfície do meio com o auxílio de um swab estéril. Quatro pequenos poços equidistantes (diâmetro 6 mm) foram

feitos no centro da placa e 60 µl do extrato das plantas foram adicionados aos poços na concentração padronizada de 10 mg/ml. Foram empregados os seguintes controles: anfotericina B (5 mg/L; Sigma Chemical Co.) e griseofulvina (1 mg/mL; Sigma Chemical Co), para as cepas de *C. albicans* e *M. canis*, respectivamente. Adicionalmente, todas as cepas foram testadas frente ao DMSO (100%), empregado como diluente dos extratos vegetais. As placas foram incubadas a 28 °C e a leitura foi feita após 3 a 5 dias para *C. albicans* e 5 a 8 dias para *M. canis*. O diâmetro da zona de inibição do crescimento ao redor do poço foi medido em milímetros com uso de halômetro e registrado nas quatro direções radiais diferentes. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes. Foi considerada satisfatória a presença de halo de inibição maior ou igual a 10 mm bem como atividade antifúngica contra ambas as espécies fúngicas testadas (*C. albicans* e *M. canis*). Para controle de qualidade, foram utilizadas as cepas *C. albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), e *C. krusei* (ATCC 6528).

- Método de microdiluição em caldo

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram empregados apenas os extratos que mostraram atividade antifúngica por meio do teste de difusão em ágar. Para tanto, foi empregado o método de microdiluição em caldo segundo o documento M27-A2 (CLSI, 2002) para cepas de *C. albicans*. Para as cepas de *M. canis* foi utilizado o protocolo descrito por Brilhante et al. (2004) o qual foi adaptado a partir do documento do CLSI M 38-A (CLSI, 2002).

Os extratos vegetais foram avaliados nas concentrações nos intervalos de concentrações de 0,005 a 2,5 mg/mL; As drogas-controle foram testadas nas concentrações de 0,125 a 64 µg/mL. O ensaio de microdiluição foi realizado em placas contendo 96 cavidades, em volume total de 200 µL. As placas foram incubadas a 35°C e as leituras foram realizadas após 2 dias para *C. albicans* e 5 dias para *M. canis*. Todos os testes foram realizados em duplicata. A leitura dos testes foi feita através de comparação visual com o controle de crescimento fúngico sem droga. Foram empregados os parâmetros de inibição total (CIM

100%) ou parcial (80%) do crescimento (Brilhante et al., 2004; Fontenelle et al., 2007). Para controle de qualidade, foram utilizadas as cepas *C. albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6528).

- Determinação da toxicidade e da Concentração Letal (CL₅₀)

A avaliação da toxicidade dos extratos vegetais com atividade antifúngica frente a *Artemia salina* foi realizada segundo o método descrito por MEYER (1982), com adaptações. Para determinação da toxicidade, foram utilizadas larvas de *A. salina*, nas fases de metanáflio II e III. Inicialmente, cistos de *A. salina* (0,5 g) foram lavados em água filtrada por 1 hora e, em seguida, transferidos para água salgada (salinidade de 10 a 15%), sendo mantidos sob iluminação artificial e aeração abundante durante um período de 36 a 48 horas, até eclosão dos cistos. Após esse período, as larvas eclodidas foram separadas e incubadas em água salgada por um período de 24 horas, até a fase de metanáflio II ou III. Decorridas 48 horas, as larvas foram consideradas adequadas para os testes de toxicidade. Os extratos com atividade antifúngica foram testados nas seguintes concentrações: 300, 250, 225, 200, 175, 150, 125 e 100 mg/mL. Os ensaios foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução-teste e 10 larvas de *A. salina*. Os tubos com as devidas concentrações foram incubados a 29 °C (± 1 °C) sob iluminação artificial (luz branca) por um período de 24 horas. Um grupo controle também foi preparado nas mesmas condições dos tratamentos, mas sem a presença da substância-teste. Após este período foi realizada a contagem do número de larvas mortas nos diferentes tratamentos e no grupo controle. A CL₅₀, 24 h (concentração letal para 50% das larvas) com intervalo de confiança de 95% foi determinada para cada extrato de acordo com método já descrito (Litchfield & Wilcoxon 1949).

- Análise Estatística

A atividade antifúngica avaliada pelo método de difusão em ágar foi expressa como média \pm desvio padrão do diâmetro de crescimento da zona de

inibição (mm). A atividade antifúngica dos extratos foi analisada por correlação linear por análise individual e teste T-Student pareado foi utilizado para avaliar as diferenças entre os dados dos extratos e dos controles. Já para o cálculo da CL 50, foi utilizado o aplicativo Trimmed Spersman-Karber Method Version 1.5.

- Resultados

Dentre os extratos testados, apenas aqueles obtidos de *M. oileifera* e *Vernonia* sp. mostraram atividade antifúngica por meio do método de difusão em ágar frente a *C. albicans* (3/8) e *M. canis* (7/7) (Tabela 1). O extrato TVS-H apresentou atividade frente *C. albicans*, com halos de inibição de 10 mm, bem como frente a *M. canis*, cujos halos de inibição variaram de 12,5 a 28,0 mm. O extrato MLF-C apresentou atividade frente *C. albicans* e *M. canis* com halos variando de 13,0 – 14,0 mm e 17,5 – 37,0 mm, respectivamente.

Com relação à concentração inibitória mínima (CIM), os valores podem ser observados na tabela 2. A CIM (80%) de TVS-H e MLF-C frente *C. albicans* variou de 0,156 a 2,5 mg/mL; enquanto em cepas de *M. canis* foi de 0,039 a 0,625 e 0,039 a 1,25 mg/mL, respectivamente. A CIM (100%) de TVS-H e MLF-C frente *C. albicans* variou de 0,625 a > 2,5 mg/mL; enquanto em cepas de *M. canis* foi de 0,078 a 1,25 e 0,039 a 2,5 mg/mL, respectivamente. No controle de qualidade do experimento, a Anfotericina B apresentou valores de CIM de 1µg/mL frente cepa controle ATCC 22.019 (*C. parapsilosis*), enquanto que, a griseofulvina, apresentou valores de CIM de 0,25µg/mL frente à cepa de *M. canis* padrão do CEMM (CEMM 01-03-088).

O teste para determinação da toxicidade frente *A. salina*, apresentou os seguintes resultados: para o extrato TVS-H, a CL50 estimada foi de 204,17 mg/mL, com intervalo de confiança de 95% variando entre 211,28 a 197,31 mg/mL, enquanto que o extrato MLF-C apresentou CL50 estimada de 201,09 mg/mL, com intervalo de confiança de 95% variando de 216,25 a 187 mg/mL.

- Discussão

Nos últimos anos, o aumento da incidência das micoses tem alterado o perfil epidemiológico dessas infecções em todo o mundo (Petrikkos & Skiada, 2007). O uso terapêutico e/ou profilático indiscriminado de antibióticos e imunossuppressores; o aumento da população imunossuprimida por infecções virais, particularmente a AIDS, e o progresso técnico nos procedimentos cirúrgicos, em especial àqueles relacionados aos transplantes de órgãos sólidos, têm contribuído para o aumento dessas infecções (Dixit et al., 2009). Acredita-se que parte da dificuldade existente no tratamento das infecções fúngicas esteja relacionada ao limitado número de drogas de uso terapêutico (George & Selitrennikoff, 2006). Este cenário possui grande impacto também em Medicina Veterinária, haja vista o crescente relato de casos de dermatomicoses (Brilhante et al., 2003; Prado et al., 2008; Brito et al. 2009), bem como o isolamento de microrganismos exibindo resistência primária *in vitro* aos antifúngicos (Brito et al. 2009; Sidrim et al. 2010). Adicionalmente, a ocorrência de dermatofitose em humanos, por contaminação zoofílica, tem sido relatada (Cafarchia et al., 2006; Bond, 2010). Nesta perspectiva, estudos têm sido realizados por nosso grupo de pesquisa visando à descoberta de fitoquímicos com propriedades antifúngicas (Fontenelle et al., 2007; Fontenelle et al., 2008; Leite et al., 2009).

M. oleifera é uma das espécies mais comuns da família Moringaceae. A planta é usada há muitos anos pelos seres humanos e vem sendo estudada intensamente devido às suas diversas propriedades farmacológicas, que incluem atividades antiinflamatória, anti hipertensiva e antitumoral (Fahey et al., 2005). Estudos recentes mostraram a atividade antifúngica de extratos e óleo essencial de *M. oleifera* (Chuang et al., 2007), frente a diversas espécies fúngicas, tais, como: organismos do gênero *Aspergillus* (Kekuda et al., 2010), bem como *Penicillium sclerotigenum*, *Cladosporium cladosporioides* (Oluduro et al., 2010), levando ao grande interesse da comunidade científica. Segundo Chuang et al. (2007), o extrato de sementes e óleo essencial *M. oleifera* possui atividade inibitória frente aos dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*, mostrando CIMs variando de 0,2 a 1,6

mg/mL. No presente estudo foi mostrado que o extrato de flores de *M. oleifera* também é capaz de inibir o crescimento de *M. canis*, exibindo CIMs que variaram de 0,03 a 2,5 mg/mL.

Vernonia sp. compreende espécies de plantas herbáceas comuns em resquícios de Mata Atlântica, com conhecida atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *Penicillium citrinum* (Freire et al., 1998). Estudo realizado por Ogundare et al. 2006, mostrou que extratos obtidos da casca de *V. tenoreana* inibiram o crescimento de *C. albicans*, *Aspergillus flavus* e *A. niger*, com CIMs de 15 mg/mL. O presente estudo sugere que o extrato obtido dos talos de *Vernonia* sp. é mais eficaz frente a *C. albicans*, haja vista os menores valores de CIMs encontrados, quando comparado com os extratos obtidos da casca de *V. tenoreana*,

Embora existam muitos estudos sobre as propriedades antifúngicas de *M. oleifera* e *Vernonia* sp., a grande diversidade de metodologias empregadas na obtenção dos extratos, bem como na realização dos testes de sensibilidade *in vitro* dificultam a comparação dos dados.

O presente estudo adiciona dados importantes sobre o potencial antifúngico dos extratos de *M. oleifera* e *Vernonia* sp. frente aos patógenos *C. albicans* e *M. canis* – sendo este o primeiro relato de atividade antifúngica de extrato de *Vernonia* sp. para este dermatófito. Os dados apresentados abrem perspectiva para a realização de estudos fitoquímicos guiados, a fim de se identificar os compostos responsáveis pela atividade antifúngica detectada. Estudos prévios têm apontado que flavonóides, alcalóides e taninos, bem como triterpenóides, saponinas, coumarinas e antraconas, como compostos importantes na composição química desses produtos (Braga et al., 2006).

Embora já tenha sido relatada atividade antifúngica em extratos de *Baccharis* spp. (Morales et al., 2008), *Croton jacobinensis* (Ramos et al. 2009), *Croton jacobinensis*, *Lippia alba* (Aguiar et al., 2008, Hennebelle et al., 2008) Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum* (Faria et al., 2006), o presente estudo mostrou que os extratos oriundos desses vegetais apresentaram reduzida ou nula atividade inibitória frente aos modelos biológicos empregados, haja vista

o reduzido tamanho dos halos de inibição encontrados (< 10 mm). Novamente, discrepâncias nos procedimentos metodológicos de obtenção dos extratos podem estar relacionadas aos resultados encontrados.

A reduzida toxicidade dos extratos de *M. oleifera* e *Vernonia* sp. no modelo biológico de *A. salina*, o qual possui boa correlação com o modelo murino (Logarto et al., 2001), reforça o potencial fitoterápico antifúngico destes produtos naturais.

Por fim, conclui-se que os extratos de *M. oilifera* e *Vernonia* sp. possuem atividade antifúngica frente cepas de *C. albicans* e *M. canis in vitro* e baixa toxicidade no modelo de *A. salina*, abrindo a perspectiva de estudos para caracterização química dos componentes bioativos, que devem ser testados isoladamente contra este fungos e avaliados em protocolos de toxicidade subaguda, aguda e crônica, para posteriormente serem usados em modelos experimentais *in vivo*.

- Referências

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C. C. D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K. X. F. R.;
Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).
Braz. J. Pharmacogn. v. 18, n.3, p. 436-440, 2008.

ALVES, P.M; LEITE P.H.A.S; PEREIRA, J.V. et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 192-196, 2006.

BOND, R. Superficial veterinary mycoses. *Clin Dermatol.*, v.4, p. 226-236, 2010.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol.*, v. 111, p. 396-402, 2006.

BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G. et al. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brasil: the role of *Trichophyton tonsurans*. *Int. J. Dermatol.*, v. 43, p. 575-579, 2004.

BRILHANTE, R.S.N.; CAVALCANTE, C.S.; SOARES-JUNIOR, F.A. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia*, v. 156, p. 303-308, 2003.

BRITO, E.H.; FONTENELLE, R.O.; BRILHANTE, R.S. et al. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *Vet. J.*, v. 182, p. 320-326, 2009.

BRITO, E.H.; FONTENELLE, R.O.; BRILHANTE, R.S. et al. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *Vet J.*, v.174, p. 147-153, 2007.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G. et al. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis tinea corporis*. *Vet. Dermatol.*, v. 17, p. 327-331, 2006.

CHUANG, P.-H.; LEE, C-W.; CHOU, J.-Y. et al. Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresour Technol.*, v. 98, p. 232-236, 2007.

DIXIT, A.; CARROLL, S.F.; QURESHI, S.T. *Cryptococcus gattii*: An emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* v. 2009, 840452, 2009.

FAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal*, v.1, p.1-5, 2005.

FARIA T.J.; FERREIRA R.S.; YASSUMOTO L.; SOUZA J.R.P.; ISHIKAWA N.K.; BARBOSA A.M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 867-871. 2006.

FONTENELLE, R.O.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 59, p. 934-940, 2007.

FONTENELLE, R.O.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H. ET al. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *J. Appl. Microbiol.* , v. 104, p. 1383-1390, 2008.

FREIRE, M. F. I; ABREU, H. S. Extratos de Raízes de *Vernonia scorpioides* com potencial antibiótico contra *Penicillium citrinum*. XIII Congresso latino Americano de Ciência do Solo – I Reunião Brasileira de Biologia do Solo - IV Simpósio Brasileiro Sobre Microbiologia do solo - VI Reunião Brasileira sobre Micorrizas e XI Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e da Água. Águas de Lindóia, SP- Brasil - 4 a 8 de agosto de 1996.

GEORGE, S.ST.; SELITRENNIKOFF, C.P. Identification of novel cell-wall active antifungal compounds. *Int J Antimicrob Agents*, v. 28, p. 361-365, 2006.

GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T. et al. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *J. Ethnopharmacol.*, v. 97, p. 409-412, 2005.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia Alba*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 116 p.211–222, 2008.

KEKUDA, T.R.P.; MALLIKARJUN, N.; SWATHI, D. et al. Antibacterial and Antifungal efficacy of steam distillate of *Moringa oleifera* Lam. *J. Pharm. Sci. & Res.*, v. 2, p. 34-37, 2010.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, v. 30; p. 1135-1144, 2002.

LEITE, J.J.G.; BRITO, E.H.; CORDEIRO, R.A. et al. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 24, p. 110-113, 2009.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 96: 99–113, 1949.

LOGARTO, P.A.; SILVA, Y.R.; GUERRA, S.I.; IGLESIAS, B.L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v.8, p. 395-400, 2001.

MENDOZA, M.H.; MENDOZA, J.H., ALONSO, J.M. et al. A zoonotic ringworm outbreak caused by a dysgonic strain of *Microsporum canis* from stray cats. *Rev Iberoam Micol.*, v. 27, p. 62-65, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31-34, 1982.

MORAN, C.; GRUSSEMEYER, C.A.; SPALDING, J.R. et al. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control.*, v. 38, p. 78-80, 2010.

MORALES, G.; PAREDES, A.; SIERRA, P.; LOYOLA, L.A. Antimicrobial Activity of Three *Baccharis* Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile. *Molecules*, v.13, n.4, p.790-794. 2008.

OGUNDARE, A.O.; ADETUYI, F. C.; AKINYOSOYE, F.A. Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. *African J. Biotechnology*, v. 5, p. 1663-1668, 2006.

OLUDURO, O.A.; ADERIYE, B.I.; CONNOLLY, J.D.; AKINTAYO, E.T.; FAMUREWA, O. Characterization and antimicrobial activity of 4-(β -D-glucopyranosyl-1 \rightarrow 4- α -L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl thiocarboxamide; a novel bioactive compound from *Moringa oleifera* seed extract. *Folia Microbiol.*, v.55, p. 422-426, 2010.

PETRIKKOS, G; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*, v. 30, p. 108-117, 2007.

PRADO, M.R., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A. et al. Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *J Vet Diagn Invest.*, v. 20, p. 197-202, 2008.

RABELO, M. *Avaliação do efeito antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial de Ocimum gratissimum (OEOG) Labiatae*. 2003. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; CASTELAR, I.; CARVALHO, A. F. F. U; LIMA-FILHO, J. V.; Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Rev. bras. farmacogn.* v.19, n.2, p.376-381, 2009.

RUKAYADI, Y.; SHIM, J.-S; HWANG, J.-K. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses*, v. 51, p. 308–312, 2008.

SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BRILHANTE, R. S. N.; SOARES, G.D.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology*, 2010.

SIMÕES CMO, GOSMANN G, SCHENKEL EP 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. *J. Ethnopharmacol.*, v. 51, p. 1-15, 1996.

VALGAS, C. *Avaliação de métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais*. 2002. 103fp. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Centro De Ciências Da Saúde, Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis.

1 **Tabela 1.** Atividade antifúngica de extratos TVS-H e MFL-C na concentração de 10mg/mL frente a *C. albicans* e *M. canis* através do
 2 método de difusão em ágar.
 3

Zona de inibição (mm)							
<i>Candida albicans</i>	TVS-H	MFL-C	Anfotericina B (1mg/mL)	<i>Microsporium canis</i>	TVS-H	MFL-C	Griseofulvina (64µg/mL)
CEMM 01-2-165	-	-	19,0	CEMM 01-3-179	18,0	30,0	40,0
CEMM 02-1-070	10,0	14,0	19,0	CEMM 01-3-088	18,5	17,5	48,0
CEMM 01-5-004	10,0	14,0	20,0	CEMM 01-3-162	12,5	22,5	45,0
CEMM 01-5-005	10,0	13,0	19,0	CEMM 01-3-165	28,0	37,0	41,0
CEMM 03-2-033	-	-	17,0	CEMM 01-5-190	12,5	18,0	40,0
CEMM 01-2-078	-	-	16,0	CEMM 01-3-164	17,0	21,0	39,0
CEMM 01-4-037	-	-	16,0	CEMM 01-3-168	16,0	19,0	41,0
CEMM 01-5-006	-	-	17,0				

4 - sem inibição do crescimento
 5
 6
 7
 8

9 **Tabela 2.** Concentração inibitória mínima dos extratos brutos de TVS-H (*Vernonia* sp.) MLF-C (*Moriga oilifera*) frente *C. albicans* e *M. canis*
 10 por meio do método de microdiluição em caldo.

<i>Candida albicans</i>	TVS-H		MLF-C		<i>Microsporium canis</i>	TVS-H		MLF-C	
	MIC (mg/mL)		MIC (mg/mL)			MIC (mg/mL)		MIC (mg/mL)	
	100%	80%	100%	80%		100%	80%	100%	80%
CEMM 02-1-070	1,25	0,625	1,25	0,625	CEMM 03-2-023	0,156	0,078	0,078	0,039
CEMM 01-4-037	1,25	0,625	1,25	0,625	CEMM 01-4-080	0,312	0,156	1,25	0,625
CEMM 01-2-184	1,25	0,625	>2,5	0,625	CEMM 01-3-179	0,156	0,078	0,039	0,039
CEMM 01-5-004	0,625	0,312	0,625	0,312	CEMM 01-3-162	0,312	0,156	2,5	1,25
CEMM 01-5-005	1,25	0,625	0,625	0,312	CEMM 01-3-168	0,625	0,312	1,25	0,625
CEMM 01-5-006	2,5	1,25	>2,5	0,156	CEMM 01-3-164	0,078	0,039	0,078	0,039
CEMM 01-5-012	2,5	1,25	>2,5	2,5	CEMM 01-3-165	0,156	0,078	0,156	0,078
CEMM 02-2-170	1,25	0,312	>2,5	0,625	CEMM 01-3-088	0,156	0,078	0,625	0,312
CEMM 02-2-261	0,625	0,156	>2,5	0,156	CEMM 01-5-188	1,25	0,625	1,25	0,625
CEMM 03-2-033	2,5	1,25	>2,5	0,312	CEMM 01-3-167	1,25	0,625	0,078	0,039
CEMM 01-2-078	>2,5	2,5	1,25	0,625	CEMM 01-3-170	0,625	0,3125	0,3125	0,156
CEMM 01-3-077	2,5	1,25	>2,5	0,312	CEMM 02-6-074	0,156	0,078	0,625	0,312

11

12

7 CONCLUSÕES

1- Os extratos das plantas *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp. apresentam atividade antifúngica frente a cepas de *C. albicans* e *M. canis*, mostrando halo de inibição ≥ 10 mm, no método de difusão em agar;

2- Os extratos das plantas *Licania rigida* Benth., *Croton jacobinensis* Bail., *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce., *Baccharis ligustrina* DC., *Baccharis schultzi* Baker. E os óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Quimiotipos 1, 2, 3 e 4) e *Ocimum gratissimum* não apresentaram atividade antifúngica satisfatória (halo de inibição ≥ 10 mm contra ambas as espécies - *C. albicans* e *M. canis*), no método de difusão em ágar;

3- A concentração inibitória mínima que mata 100% das cepas, para os extratos *Vernonia* sp. e *Moringa oleifera* frente *C. albicans* é alta (0,625 a $> 2,5$ mg/mL); enquanto em cepas de *M. canis* é menor (0,039 a 2,5 mg/mL);

4- Os extratos de *Vernonia* sp. e *Moringa oleifera* apresenta larga margem de segurança, com CL50 de 204,17 e 201,09 mg/mL, respectivamente, no modelo experimental de *Artemia salina*.

8 PERSPECTIVAS

Os extratos de *M. oleifera* e *Vernonia* sp. apresentaram atividade antifúngica frente cepas de *C. albicans* e *M. canis*, abrindo a perspectiva de estudos para caracterização química dos componentes bioativos, que devem ser testados isoladamente contra estes fungos. Caso seja observada uma atividade antifúngica positiva, tais compostos serão avaliados em protocolos de toxicidade subaguda, aguda e crônica, para posteriormente serem usados em modelos experimentais *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALVES, P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, L.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.16. n.2, p. 192-196, 2006.

AVANTE, M. L.; CAMPOS, C. P.; FERREIRA, M.M.G.; MARTINS, I.S.; ROSA, B.R.T.; SOUZA, G. D. P.; AVANZA, M. F. B. Dermatofitose em grandes animais, *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 7, n. 12, 2009.

BARTH, M.O.; MAIORINO, C.; BENATTI, A.P.T.; BASTOS, D.H.M. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados indicados monoflorais do sudeste do Brasil, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 229-233, 2005.

BENTUBO, H.D.L.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; TEIXEIRA, R.H.F.; COUTINHO, S.D. Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of health wild felids kept in captivity in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 148-152, 2006.

BEZERRA, A.M.E.; MOMENTÉ, V.G.; MEDEIROS-FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato, *Horticultura Brasileira*, v.22, n.2, p.295-299, 2004.

BIANCALANA, S.C.; TELLES, P.F.G.; LYRA L.E.; SCHREIBER A.Z. Preanalytical conditions for broth microdilution antifungal susceptibility of *Microsporum* spp., *Mycoses*, v. 51, p. 313–317, 2008.

BRASCH J. Current knowledge of host response in human tinea, *Mycoses*, v.52, p.304–312, 2009.

BRILHANTE, R.S.N. Estudo das dermatofitoses canina e felina: Aspectos epidemiológicos e comportamentais do *Microsporium canis* frente a diferentes métodos de estocagem. Fortaleza, 2002. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará.

BRILHANTE, R.S.N.; CAVALCANTE, C.S.; SOARES-JUNIOR, F.A. High rate of *Microsporium canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features, *Mycopathologia*, v. 156, p. 303-308, 2003.

BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J.J.C. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brasil: the role of *Trichophyton tonsurans*, *Tropical Medicine Rounds*, v. 43, p. 575-579, 2004.

BRITO, E.H.S.; FONTENELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO R. A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs, *The Veterinary Journal*, v.182, n. 2, p. 320-326, 2009.

BRITO, E.H.S.; FONTENELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R. A.; JÚNIOR, F.A.S.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G.; Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs, *The Veterinary Journal*, v. 174, p.147-153, 2007.

CABAÑES, F.J. Dermatofitosis animales. Recientes advances, *Revista Iberoamericana de Micología*, v.17, p. 8-12, 2000.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Isolation of *Microsporium canis* from the hair coat of pet dogs and cats

belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis, *European Society of Veterinary Dermatology*, v. 17, p. 327-331, 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CHONG, P.P.; HADI, S.R.A.; LEE, Y.L.; PHAN, C.L.; TAN, B.C.; NG, K.P.; SEOWD, H.F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-*albicans* species with non-pregnant status, *Infection, Genetics and Evolution*, v. 7, p. 449–456, 2007.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B. J.; CHEN, H.M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam, *Bioresource Technology*, n.98, p. 232-236, 2007.

CLSI, Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos: Norma aprovada. Brasília, DF, v. 22, n. 16, p. 1-29, 2002.

CLSI, Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada. Brasília, DF, v. 22, n. 15, p. 1-51, 2002.

CORRÊA, R.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; ALVES, T.L. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes tipos de secagem, *Ciência e Agrotecnologia*, v.28, n.2, p. 339-344, 2004.

CYSNE, J.R.B. Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L. Fortaleza, 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DAHOT, M.U. Vitamin contents of the flowers and seeds of *Moringa oleifera* L., *Journal of Biochemistry*, v.21, n.1-2, p.21-24, 1998.

EILERT, U.; WOLTERS, B.; NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of *Moringaoleifera* and *Moringa stenopetala*, *Journal Medicinal Plant Reserch*, v.42, p.55-61, 1981.

FAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1, *Trees for Life Journal*, p.1-15, 2005.

FERNANDES, T.M. *Plantas Mediciniais*: memória da ciência no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. p.260, 2004.

FOLKARD, G.K.; SUTHERLAND, J.P.; GRANT,W.D. *Natural coagulants at pilot scale*; In: Pickford,J., ed. *Water, Environment and Management: Proc. of the 18th WEDC Conference, Kathmandu, Nepal, 30 Aug.-3 Sept.1992*. Loughborough University Press, p51-54, 1993.

FONTENELE, A.F.; CARVALHO, U.; MELO, V.M.M.; BRAGA; L.M.; AGUIAR,A.; FONTENELLE, R. O. S. Avaliação do potencial antifúngico de óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro frente a diferentes cepas de *Microsporum canis*, *Candida spp* e *Malassezia pachydermatis*. Dissertação (Mestrado em Curso de Pós Graduação Em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará. 2005.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome, *Journal of Applied Microbiology*, v, 104, n. 5, p. 1383-1390, 2007.

FONZI, W.A. The protein secretory pathway of *Candida albicans*, *Mycoses*, v. 52, n. 4, p. 291 – 303, 2008.

FREIRE, M. F. I; ABREU, H. S. Extratos de Raízes de *Vernonia scorpioides* com potencial antibiótico contra *Penicillium citrinum*. XIII Congresso latino Americano de Ciência do Solo – I Reunião Brasileira de Biologia do Solo - IV Simpósio Brasileiro Sobre Microbiologia do solo - VI Reunião Brasileira sobre Micorrizas e XI Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e da Água. Águas de Lindóia, SP- Brasil - 4 a 8 de agosto de 1996.

FUGLIE, L. J. The miracle tree: *Moringa oleifera*. Natural nutrition for the tropics. Church World Service, Dakar, Senegal, p.63, 1999.

GARCIA, M.E.; BLANCO, J.L. Principales enfermedades fúngicas que afetam a los animales domésticos, *Revista Iberoamericana de Micología* v. 17, p. S2-S7, 2000.

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 dermatophytes, *Journal Ethnopharmacol*, v. 97, p. 409-412, 2005.

GURTLER, T.G.R.; DINIZ, L.M.; NICCHIO, L. Microepidemia de tinha do couro cabeludo por *Microsporum canis* em creche de Vitoria – Espírito Santo (Brasil), *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n.3, p.267-272, 2005.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F.; Ethnopharmacology of *Lippia Alba*, *Journal of Ethnopharmacology*. v.116, p.211–222, 2008.

IWALEWA, E.O.; IWALEWA, O.J.; ADEBOYE, J.O. Analgesic antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* Less. Leaf, *Journal of Ethnopharmacology*, v.86, p.229, 2003.

JABEEN, R.; SHARID, M.; JAMIL, A.; ASHRAF, M. Microscopic Evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*, *Pakistan Journal of Botany*, v. 40, n. 4, 2008.

JAHN, S.A.A.; MUSNAD, H.A.; BURGSTALLER, H. The tree that purifies water: Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan, *Unasylva*, v.38, p.23-28, 1986.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DOOGHUE M.J.; Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sunderland, Ma, Sinauer Associates, Inc (2008).

KALKANCI, A.; BERK, E.; AYKAN, B.; CAGLAR, K.; HIZEL, K.; ARMAN, D.; KUSTIMUR, S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida species* isolated from hospitalized patients, *Journal de Mycologie Médicale*, v. 17, p. 16-20, 2007.

KUNLE, O.F.; EGHAREVBA, H.O.; IBRAHIM, J.; ILIYA, I.; ILIYA, A.; MAKAILU, S.; OKWUTE, S.K., OKOGUN, J.I. Antimicrobial activity of the Extract of *Vernonia Ambigua* (Aerial Part). *Researcher*, n 2, v.6, p. 74-80. 2010.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E.M.; TAKAHASHI, N. Guia para identificação. Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico. São Paulo: Savier, 1998, 445p.

LAGO, J.H.G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; SOARES, M.G.; BARALDI, P.T.; CORRÊA, A.G.; SOUZA, F.O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* DE “CAMPOS DE ALTITUDE” da mata Atlântica Paulista, *Química Nova*, v. 31, n. 4, p. 727-730, 2008.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.95, p.99-113, 1949.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 346-347, 2002.

MAIA, A.I.V.; TORRES, M.C.M.; PESSOA, O.D.L.; MENEZES, J.E.S.A.; COSTA, S.M.O.; NOGUEIRA, V.L.R.; MELO, V.M.M.; SOUZA, E.B.; CAVALCANTE, G.B.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia Remotiflora* e *Vernonia Brasiliana*: composição química e atividade biológica, *Química Nova*, v.33, n.3, p.584-586, 2010.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; BACHMANN, S.P.; MARTINS, C.V.B.; DA SILVA, D.L.; NERES, A.T.M.; MAGALHÃES, T.F.F.; WATANABE, G.A.; MODOLO, L.V.; SABINO, A.A.; DE FÁTIMA, Â.E.; RESENDE, M.A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.63, p.337–339, 2009.

MATOS, F.J.A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 220 p. 1998.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe Editorial, 1999. p.11-17.

MOREIRA, F.P.M.; BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M.G.; MORAIS, A.A.; MONACHE, F.D.; Acid triterpenes and flavonoids from *Baccharis ligustrina* (Astracã), *Biochemical Systematics and Ecology*, v.31, 319–321, 2003.

OKUDA, T.; BAES, A.U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research*, v.35, n.2, p. 405-410, 2001.

OLIVEIRA, V.M. Caracterização cariotípica de espécies de *Vernonia* Schreb. (Asteraceae: Vernonoeae) com técnicas de diferencial longitudinal de cromossomos (bandamentos e hibridização de DNA *in situ*. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, São Paulo, 2008.

OZAWA, H.; OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATARI, T.; WATANABE, S.; PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; McATEE, R.K.; SANTILLAN, R.A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD D.; PATTERSON, T.F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 676–2684, 2001.

PEREA, S.; RUESGAB, M. T.; PATTERSON, T. F. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 515-524, 2002.

PESSONI, R.A.; OLMEDO, P.M.O; CLEMENTE-FILHA, A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Produção de concentrados de frutose por inulinas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, p.372-377. 2004.

POSTERARO, B.; TUMBARELLO, M.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; TRECARICHI, E. M.; DE BERNARDIS, F.; SCOPPETTUOLO, G.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 8, p. 3046-7, 2006.

RABELO, M. Avaliação do efeito antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OEOG) Labiatae. Fortaleza, 2003. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará.

RAHMAN, M.M.; SHEIKH, M.M.I.; SHAMIMA, A.S.; ISLAM, M.S.; RAHMAN, M.A.; RAHMAN, M.M.; ALAM, M.F. Antibacterial Activity of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some human pathogenic bacteria. *Chiang Mai University Journal of Natural Science*, v. 8, n. 2, p. 219-227, 2009.

RIVERA, V.L. 2006, “Estudos fitogeográficos em *Vernonia* Schreb. sensu lato (Asteraceae) no Bioma Cerrado”, 119f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília.

RUKAYADI, Y.; SHIM, J.S.; HWANG, J.K. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity, *Mycoses*, v.51, p.308–312, 2008.

SANGLARD, D.; ODSS, F.C. Resistance on *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences, *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 73-85, 2002.

SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BRILHANTE, R.S.N.; SOARES, G.D.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. Candida species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology*, *in press*, 2010.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 1-15, 1996.

SPETH, C.; RAMBACH, G.; WÜRZNER, R.E.; LASS-FLÖRL, C. Complement and fungal pathogens: an update, *Mycoses*, v. 51, p.477–496, 2008.

TONA, L.; CIMANGA, R. K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plant used in the Democratic Republic of Congo, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, p. 27-32. 2004.

VALGAS, C. Avaliação de métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais. Florianópolis, 2002. 103p. Dissertação (Mestrado Em Farmácia) - Centro De Ciências Da Saúde Universidade Federal De Santa Catarina.

ZAITZ, C. Compêndio de micologia médica. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.434, 2010.