

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

AnaCristinaMachadoSouza

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE
Hymenaea martiana

Orientadora:

Prof.^a Dra MariadoRosárioRodriguesSilva

Dissertação de Mestrado

Goiânia – GO
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

AnaCristinaMachadoSouza

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE
Hymenaea martiana

Orientadora:

Prof.^a Dra MariadoRosárioRodriguesSilva

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Medicina Tropical do
Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública da Universidade Federal de Goiás,
na área de concentração de Microbiologia.

Goiânia – GO
2008

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio e Márcia por ser presença constante em minha vida. Aos meus irmãos Antônio Júnior, Ana Claudia e Diego pelo carinho e apoio em todos os momentos. Obrigado pelas conversas, pelo amor, pela dedicação e por me ensinar que o mais importante na conquista é aprender a superar nossos limites.

A vocês todo o meu amor

Agradecimentos

A Deus por todas as bênçãos recebidas. Agradeço pela vida, por ter me dado forças para que eu pudesse chegar ao final de mais uma jornada. Por isso te louvo e agradeço.

A toda minha família, em especial meus avós Valdivino e Leonor, por compreender os vários momentos de ausência e por todo apoio que sempre recebo. Vocês são meu refúgio!

A minha querida orientadora e amiga prof^{ta} Dr^a Maria do Rosário Rodrigues Silva (Zaia), se aqui cheguei é porque exemplos me convenceram, às vezes as palavras não podem recompensar, mas quero que saiba o quanto foi importante nesta minha trajetória. Agradeço toda a confiança depositada, os ensinamentos, o carinho, as conversas maternas e as oportunidades. Obrigado por cuidar de mim!

A amiga prof^{ta} Dr^a Lúcia Kioko Hasimoto e Souza, pela gentileza e disponibilidade em todos os momentos. Foi com você que aprendi gostar da microbiologia. A você minha eterna gratidão!

A prof^{ta} Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes pelos ensinamentos, auxílios, sugestões e alegria. Você é especial!

A prof^{ta} Dr^a. Cecília Maria Alves de Oliveira e a prof^{ta} Dr^a Lucília Kato pela disponibilidade, colaboração e ajuda na realização desse trabalho.

A minha grande amiga Carolina Rodrigues Costa; seu carinho, sua dedicação, seus cuidados, conselhos e companheirismo foram importantíssimos. Agradeço por tê-la comigo nesse momento e em muitos outros que estão por vir. Obrigado minha Amiga!

A minha prima do coração Janine de Aquino Lemos pelo seu companheirismo, sugestões e carinho. Obrigada pela atenção que sempre dedicou a mim!

Aos amigos do laboratório de micologia a Davi, Fábio, Flávio, Genebaldo, Hildene, Percília e Xisto. A cada passo desta longa caminhada nos encontramos, por curto ou longo período, com mais ou menos dificuldades, mas sempre com ensinamentos e amizade.

Aos colegas da Central Goiana de Sorologia o apoio, companheirismo e compreensão de vocês foram muito importantes.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meu eterno obrigado.

Resumo

Os agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas apresentam certas limitações devido a efeitos colaterais, ao alto custo financeiro e ainda devido à resistência adquirida pelos patógenos. As plantas medicinais brasileiras são consideradas uma rica fonte de combinações, que podem ser úteis para o desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos. Substâncias produzidas pelas plantas, como produto do seu metabolismo secundário, originam uma grande variedade de compostos com propriedades antimicrobianas. As atividades antimicrobianas atribuídas ao gênero *Hymenaea* nos levaram a investigar a atividade biológica dos extratos e frações de partes desta planta. A atividade antifúngica do extrato bruto e das frações hexânica, éter dietílica, metanólica, butanólica e hidro-álcoolica usando a metodologia de microdiluição em caldo foram avaliadas sobre *Cryptococcus neoformans*, espécies de *Malazessia* e dermatófitos nesse trabalho. Os resultados da avaliação da atividade antifúngica de *H. martiana* mostraram que esta planta é ativa para *C. neoformans* e dermatófitos. Para as espécies de *Malazessia* avaliadas os extratos não mostraram inibição do crescimento fúngico. A fração hidro-alcoólica, desta planta numa concentração de 8 µg/mL inibiu 90% dos isolados de *C. neoformans*. A fração butanólica inibiu o crescimento das espécies de dermatófitos estudadas em concentrações que variaram de 8-256 µg/mL, sendo que *Trichophyton rubrum* foi a espécie mais suscetível aos extratos avaliados. Os resultados obtidos indicam que esta planta apresenta boa atividade *in vitro* sobre *C. neoformans* e dermatófitos sugerindo a necessidade de posteriores avaliações de toxicidade e pesquisas *in vivo* para sua utilização em preparações farmacêuticas.

Abstract

The antifungal agents currently used to fungal infections therapy present certain limitations due to side effects, the acquired resistance by pathogens and its high cost. The Brazilian medicinal plants are considered rich source that can be useful for development of new antifungal agents. Substances and oil that the plants produce as product of your secondary metabolism originate a variety of bioactive compounds with antimicrobial properties. Extracts of *Hymenaea spp*, offer a wide variety of bioactive compound. For these reasons, we evaluated the *in vitro* susceptibility of extracts and fractions hexane, diethyl ether, methanol, butanolic and hydroalcoholic of this plant using broth microdilution method towards *Cryptococcus neoformans*, *Malazessia* species and dermatophytes. The results showed that *H. martiana* inhibited the growth of *C. neoformans* and dermatophytes, but no showed growth fungal inhibition towards *Malazessia* specie. The hydroalcoholic fraction of this plant at concentration of 8 µg/mL inhibited 90% of *C. neoformans* isolates. The butanolic fraction was able of inhibiting the growth of dermatophytes in concentration of 8-256 µg/ml, being that *T. rubrum* was the species most susceptible. The results reported in this study showed that this plant presents good activity *in vitro* towards *C. neoformans* and dermatophytes, suggestin further studies about toxicity evaluations and research *in vivo* for use in pharmaceutical preparations.

ÍNDICE

LISTAS DAS FIGURAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
Introdução.....	1
<u>1.1 Generalidades.....</u>	<u>1</u>
<u>1.2 Fungos.....</u>	<u>2</u>
<u>1.2.1 Criptococose.....</u>	<u>4</u>
<u>1.2.2 Dermatofitose.....</u>	<u>7</u>
<u>1.2.3 Pitíriase versicolor.....</u>	<u>12</u>
<u>1.3 Antifúngicos.....</u>	<u>15</u>
<u>1.3.1 Anfotericina B.....</u>	<u>17</u>
<u>1.3.2 Derivados azólicos.....</u>	<u>19</u>
<u>1.3.3 5-Fluorcitosina.....</u>	<u>22</u>
<u>1.3.4 Griseofulvina.....</u>	<u>23</u>
<u>1.3.5 Terbinafina.....</u>	<u>23</u>
<u>1.4 Plantas medicinais e seus produtos naturais.....</u>	<u>24</u>
<u>1.5 Plantas medicinais do cerrado.....</u>	<u>26</u>
<u>1.5.1 Gênero Hymenaea.....</u>	<u>30</u>
<u>1.6 Testes de suscetibilidade.....</u>	<u>34</u>
Justificativa.....	37
Objetivos.....	38
<u>1.7 Objetivo geral.....</u>	<u>38</u>
<u>1.8 Objetivos específicos.....</u>	<u>38</u>
Referências bibliográficas.....	39
Anexo.....	64
Conclusões.....	75
Normas para publicação.....	76

LISTAS DAS FIGURAS

Figura 1: Leveduras de <i>C. neoformans</i>	4
Figura 2: Aspecto das lesões causadas por <i>C. neoformans</i>	6
Figura 3: Lesões causadas por dermatófitos	7
Figura 04: Macroscopia da colônia (A) e microscopia da cultura (B) de <i>Epidermophyton floccosum</i>	8
Figura 5: Macroscopia da colônia (A) e microscopia da cultura (B) da espécie <i>Microsporum canis</i>	9
Figura 6: Macroscopia da colônia e microscopia da cultura de <i>T. rubrum</i> (A e B) e de <i>T. mentagrophytes</i> (C e D)	10
Figura 7: Lesões hipopigmentadas de localização torácica característica da pitiríase versicolor	12
Figura 8: Morfologia do gênero <i>Malazessia sp.</i>	14
Figura 9: Evolução histórica do surgimento dos principais antifúngicos	15
Figura 10: Mecanismo de ação dos antifúngicos na célula fúngica	16
Figura 11: Estrutura química dos derivados azólicos	19
Figura 12: Distribuição do cerrado brasileiro	25
Figura 13: Árvore do jatobá	29
Figura 14: Sementes (A), frutos (B), madeira (C), folhas e casca (D) do jatobá	30
Figura 15: Estrutura de diterpenóides encontrados em <i>Hymenaea sp</i>	31
Figura 16: Estruturas isoladas de <i>H. coubaril</i> e <i>H. stignocarpa</i>	32
Figura 17: Estrutura química da astilbina isolada de <i>H. martiana</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia de Camado Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
GM	Média geométrica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LN	Leeming-Notman
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
UFC	Unidade Formadoras de Colônias

Introdução

1.1 Generalidades

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas em humanos vem aumentando, despertando o interesse no estudo de algumas enfermidades, como a criptococose, as dermatofitoses e a pitíriase versicolor.

O tratamento das micoses não é sempre efetivo, pois os antifúngicos podem levar a recidiva das infecções e podem apresentar importante toxicidade (Sharon & Sorrel 2007). Diante desse fato, a busca por novos agentes antifúngicos mais ativos, com menos efeitos colaterais e menos efeitos tóxicos tem sido de grande importância no tratamento das infecções fúngicas.

Neste contexto, os produtos naturais podem servir como alternativas de tratamento para as infecções fúngicas, com a probabilidade de possuírem menos efeitos colaterais e possuírem um baixo custo. Muitos produtos naturais são utilizados na medicina popular como antimicrobianos, antineoplásicos, anticoagulantes, antiparasitários ou ainda como imunossuppressores (Yunes & Calixto 2001, Newman et al. 2003). Assim, a pesquisa de produtos naturais para uso na terapêutica das micoses tornou-se o objetivo de estudo para diversos pesquisadores. Atividade antifúngica de *Bauhinia unguolata* L., *Bixa orellana* L., *Boerhavia hirsuta* Willd., *Cecropia pachystachia* Trec., *Hibiscus esculentus* L., *Justicia pectoralis* Jacq., *Plumbago scandens* L., *Sansevieria cylindrica* Bojer e *Ximenia americana* L tem sido demonstrada (Morais et al. 2005).

1.2 Fungos

Os fungos compreendem um vasto grupo de organismos (cerca de 1,5 milhões espécies) classificados como pertencentes ao reino *Fungi*, onde estão incluídos organismos de dimensões consideráveis, como os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como leveduras e alguns fungos filamentosos (Hawksworth et al. 1991, Mueller & Smith 2007). O Reino *Fungi* sofreu mudanças substanciais no arranjo dos vários filos nas últimas décadas, especialmente a partir do momento em que técnicas moleculares foram desenvolvidas. Segundo Hibbett et al. (2007) os fungos classificam-se em diferentes filos como: Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporida, Glomeromycota, sendo que o subreino Dikarya é composto por Ascomycota e Basidiomycota.

Entre a grande diversidade de espécies fúngicas, a maioria é considerada benéfica para o ser humano. Os fungos podem ser encontrados na natureza e são essenciais na degradação e reciclagem da matéria orgânica, participam do processo de fermentação biológica, da biossíntese de quimioterápicos e antibióticos e podem ser usados na alimentação. Entretanto, alguns fungos são capazes de causar danos à natureza e aos animais. Além de infecções em animais que podem levar à morte, grandes prejuízos econômicos são causados por fitopatógeno (Faria & Magalhães 2001, Siqueira et al. 2002, Fortes & Novaes 2006, Hay 2006).

As infecções fúngicas ou micoses segundo Hay 2006 abrangem um grupo de doenças que podem ser classificadas, quanto ao local da lesão, em superficiais, subcutâneas e sistêmicas e oportunistas (Tabela 1).

As micoses têm aumentando em pacientes imunocomprometidos, sobretudo em indivíduos transplantados, com neoplasias, em queimados, com doenças crônicas e com AIDS (Venkatesan et al. 2005).

As infecções superficiais são aquelas que afetam pele e anexos, estão distribuídas em todo o mundo e estão estreitamente relacionadas a fatores climáticos como calor e umidade. As micoses subcutâneas acometem a derme após um trauma do tecido e pode sofrer disseminação linfática, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais. As micoses sistêmicas são divididas em endêmicas ou oportunisticas, acometendo mucosas e órgãos internos. As endêmicas ocorrem em regiões específicas; enquanto as micoses sistêmicas oportunisticas são determinadas geralmente pelo hospedeiro, dependendo de condições adversas (Hay 2006)

Tabela 1: Classificação das micoses

Tipos de micoses	
Superficiais	dermatofitose, candidíase, pitíriase versicolor e infecções devido a <i>Scopulariopsis sp</i> e <i>Scytalidium sp</i>
Subcutâneas	esporotricose, micetoma, cromoblastomicose, feo-hifomicose, zigomicose
Sistêmica endêmica	histoplasmose, blastomicose, coccidioomicose, paracoccidioomicose e infecções pelo <i>Penicillium marneffe</i>
Sistêmica oportunística	candidíase invasiva, aspergilose, criptococose, fusariose, zigomicose

Fonte: Hay 2006.

Algumas infecções fúngicas como a criptococose, as dermatofitoses e a pitíriase versicolor são frequentes em nosso meio e constituem o objeto de nossa pesquisa.

1.2.1 Criptococose

A criptococose, causada por leveduras encapsuladas que fazem parte do complexo *Cryptococcus neoformans* (figura 1), é considerada uma infecção com distribuição mundial, geralmente associada à baixa imunidade celular (Pappalardo & Melhem 2003, Lin & Heitman 2006). Esta infecção tem maior ocorrência em pacientes com doenças malignas linforreticulares, em tratamento prolongado com corticosteróides, transplantados de órgãos, com diabetes mellitus, com doenças reumatológicas e pulmonares crônicas e em pacientes com AIDS (Mitchell & Perfect 1995, Korffel et al. 1998, Urbini et al. 2000).

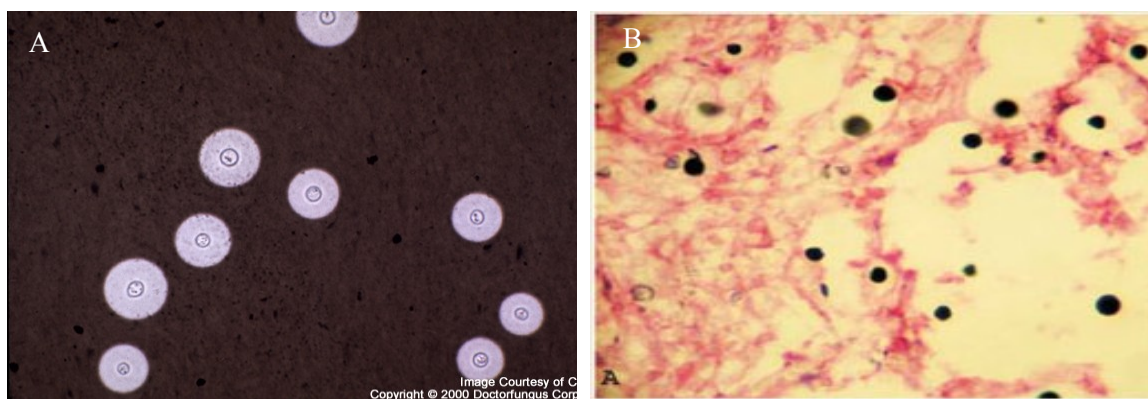


Figura 1: *C. neoformans*. A) Células arredondadas, evidenciando a cápsula mucopolissacarídica de *C. neoformans* em tinta da china, B) Histopatológico de paciente com pneumonia, evidenciando as leveduras *C. neoformans* (coloração de Grocott-metenamina-prata 400 X) (Fonte: www.doctorfungus.org/imagenban).

Atualmente, há duas espécies distintas e quatro sorotipos agentes da criptococose: *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A e D) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C). Devido a diferenças genéticas foi proposto que a espécie *C. neoformans* fosse subdividida em variedades: var. *neoformans* (sorotipo D) e var. *grubii* (sorotipo A) e o híbrido AD (Franzot et al. 1999, Kwon-Chung & Varma 2006). Outras

espécies de *Cryptococcus*, não-*neoformans* como *C. laurentii*, *C. albidus* e *C. uniguttulatus*, também são descritas como causadoras de lesões em humanos podendo produzir meningite, abscessos pulmonares, pneumonia e dermatomicoses (Khawcharoeporn et al. 2007, Pedroso et al. 2007).

Taxonomicamente, *C. neoformans* é classificado, segundo sua forma perfeita, como microrganismo pertencente ao Filo Basidiomycotina, Ordem Filobasidiales, Família Filobasidiaceae, Gênero *Filobasidiella*, Espécies *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (sorotipo A e D) e *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (sorotipo B e C) (Kwon-Chung et al. 2002, Hibbett et al. 2007).

Enquanto *C. neoformans* é de ocorrência mundial, produzindo lesões principalmente em indivíduos imunocomprometidos, *C. gattii* é normalmente restrito à determinada área geográfica, especialmente regiões tropicais e subtropicais, acometendo a maioria das vezes indivíduos imunocompetentes (Mitchell & Perfect 1995, Laurenson et al. 1996, Valiente et al 1997, Passoni 1999, Kidd et al. 2004).

C. neoformans está relacionado à presença de fezes de pombos, em ambientes urbanos ou rurais, considerados substratos naturais para o fungo (Montenegro & Paula 2000, Baroni 2001, Filiú et al. 2002, Krockenberger et al. 2002, Kobayashi et al. 2005, Khan et al. 2007). Este fungo tem sido isolado em construções antigas, torres de igreja, praças, jardins zoológicos, celeiros, estábulos e em domicílios (Swinne et al. 1991, Passoni et al. 1998, Baroni 2001, Krockenberger et al. 2002, Kobayashi et al, 2005). A alta prevalência do fungo no meio ambiente pode ser explicada pela habilidade do fungo em assimilar xantina, guanina, ácido úrico, creatinina; que são substâncias encontradas em alto teor nas fezes de aves (Filiú et al. 2002). Nas madeiras e ocos de árvores frequentemente têm sido observado a presença deste fungo. Esse microrganismo pode estar associado ao gênero *Eucalyptus* e também a outras espécies de árvores como:

Moquilea tomentosa, *Guettarda acreana*, *Cassia grandis* e *Ficus microcarpa* (Lazera et al. 2000, Fortes et al. 2001, Khan et al. 2007).

A infecção pelo *C. neoformans* ocorre pela inalação de basidiósporos e/ou leveduras que irão depositar-se nos alvéolos pulmonares determinando a forma primária da infecção. A infecção pulmonar primária em imunocompetentes pode ser assintomática ou pode ser semelhante a uma infecção como a influenza, quase sempre com resolução espontânea. No hospedeiro imunocomprometido pode haver formas pulmonares usualmente mais graves e ainda a disseminação extrapulmonar por via hematogênica, provocando lesões no sistema nervoso central (figura 2), pele (figura 2), olhos, ossos e na próstata (Steenbergen & Casadevall 2003). A preferência pelo sistema nervoso central deve-se a uma ótima concentração de tiamina, carboidratos, minerais e nutrientes assimiláveis pelo fungo, assim como a presença de dopamina e lacase que são precursores da melanina (Ikeda et al. 2002, Lin & Heitman 2006).

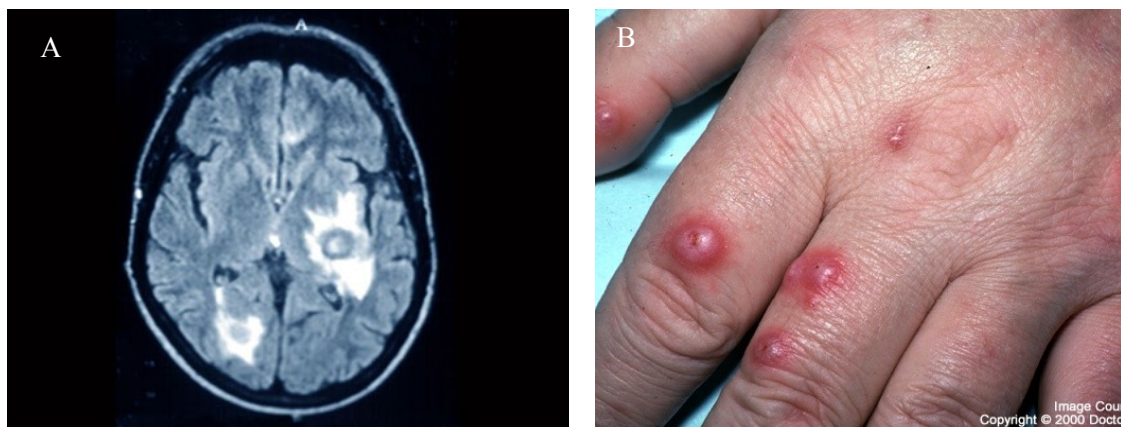


Figura 2: Lesões causadas por *C. neoformans*. A) Lesão no sistema nervoso central causada por *C. neoformans*, B) Lesão papulosa da pele causada por *C. neoformans* (Fonte: www.doctorfungus.org/imagenban).

A gravidade da criptococose pode estar relacionada ao hospedeiro ou ao próprio fungo causador da infecção. Entre os fatores relacionados ao hospedeiro, tem sido demonstrado que a proteção mais potente para essa infecção é estabelecida pelas células NK e células T (CD4 e CD8) (Mitchell & Perfect 1955, Kawakami 2002). Entre

os fatores relacionados ao microrganismo a presença da cápsula polissacarídica, capacidade de aderência, produção de urease, capacidade de crescer a 37° C, produção de manitol e melanina, *mating type* α , secreção de fosfolipase e de proteinase são característicos de maior virulência, contribuindo para a instalação da doença (Doering 2000, Vigouroux 2000, Pedroso et al. 2007).

Os antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose são a anfotericina B, 5-fluorocitosina e fluconazol (Pappalardo & Melhem 2003). Usualmente, pacientes com AIDS podem ser tratados com anfotericina B combinado ou não com 5-fluorocitosina, sendo que o fluconazol é utilizado na manutenção da terapia e para prevenir recorrências (Saag et al. 2000).

1.2.2 Dermatofitose

A infecção por dermatófitos, chamada de “dermatofitoses”, estão entre as infecções fúngicas mais prevalentes em todo mundo (Chinelli et al. 2003, Fernández-Torres et al. 2003). São infecções superficiais que invadem o extrato córneo da pele e seus anexos, que possuem alto conteúdo de queratina.

As manifestações clínicas das dermatofitoses são decorrentes das relações do hospedeiro aos metabólitos do fungo, da virulência da espécie infectante e da localização anatômica (Weitzman & Summerbell 1995). A produção de enzimas proteolíticas induz uma resposta inflamatória no hospedeiro e resulta em uma série de sintomas clínicos característicos (Liu et al. 2001). O quadro clínico da doença varia, sendo que a maioria das vezes se apresenta como superficial atingindo apenas o extrato córneo da epiderme e apêndices cutâneos (Aquino & Lima 2002). As dermatofitoses recebem a denominação genérica de *tinea* (figura 3), que acrescido do local do corpo

designa a doença clínica, assim se a micose está localizada nos pés é denominada de *tinea pedis* (Weitzman & Summerbell 1995, Barry 2003).



Figura 3: Lesões causadas por dermatófitos. A) Lesões circinadas com bordas avermelhadas características de *tinea corporis*, B) Lesões distais (bordas livres) das unhas *tinea unguium* (Fonte: www.doctorfungus.org/imagenban).

Os dermatófitos são classificados em três gêneros anamórficos: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, pertencentes à ordem Moniliales, família Moniliaceae, classe Hyphomycetes do subfilo Deuteromycota como produtores de infecção (Weitzman & Summerbell 1995). A produção de conídios é muito importante para a classificação nestes gêneros (Larone 1996).

O gênero *Epidermophyton* se caracteriza pela presença de macroconídios em forma de clava, arredondados na extremidade distal e frequentemente agrupados em um único ponto de inserção na hifa, e na ausência total de microconídios (figura 4) (Weitzman & Summerbell 1995, Simpanya 2000). O gênero é composto por duas espécies: *E. stockdaleae* e *E. floccosum*, sendo que apenas a última é capaz de produzir infecção no homem (Kano et al. 1999, Macêdo et al 2005).

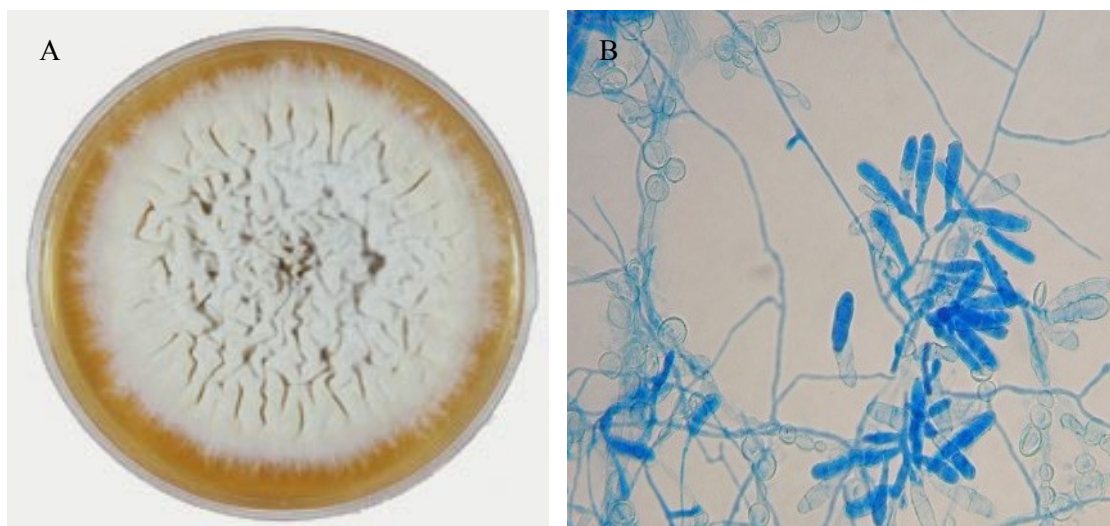


Figura 04: *E. floccosum*. A) Colônia de coloração branca a marrom com sulcos radiados, B) Macroconídios com extremidades lisas e arredondadas, presença de (Fonte: www.doctorfungus.org/imagenban).

Microsporium é um gênero que se caracteriza pela presença de macroconídios de forma navicular, com septos transversais, de parede espessa e espiculada e raros microconídios claviforme (figura 5). Algumas espécies de *Microsporium* como *M. canis*, *M. gypseum* e *M. audouinii* são mais frequentemente encontradas produzindo lesões em animais (Weitzman & Summerbell 1995, Komaid & Kestelman 2002).

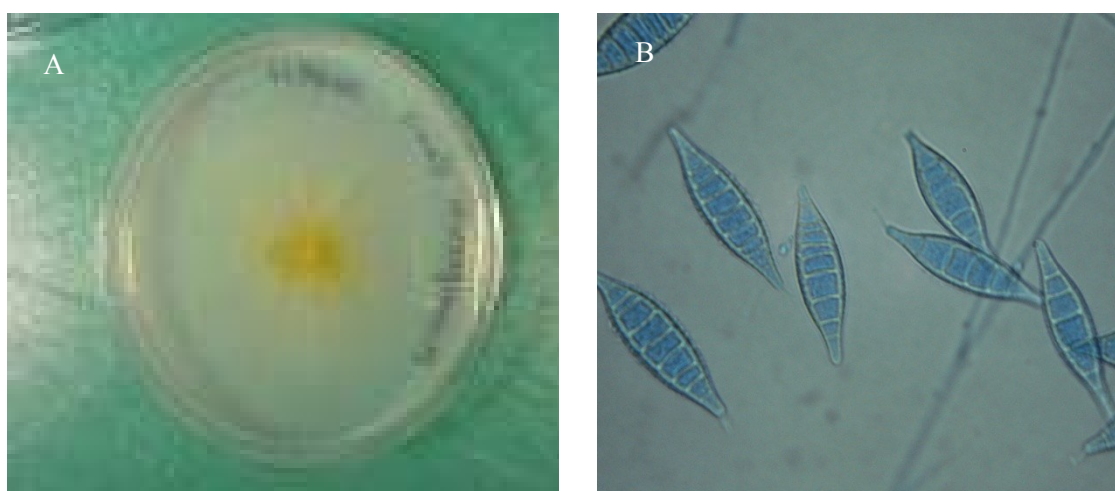


Figura 5: A) Colônia branco-amarelada, algodonosa com reverso de cor amarela de *M. canis*, B) Macroconídeos fusiforme com 8 a 10 septos de *M. canis*.(Fonte: Fotos cedidas pelo laboratório de Micologia – IPTSP/ Prof.º Fábio Silvestre Ataídes).

O gênero *Trichophyton* é composto por diversas espécies que se caracterizam geralmente pela presença de grande quantidade de microconídios piriformes, redondos ou ovalados, macroconídios multisseptados e de parede delgada (figura 6). Entre as espécies de *Trichophyton* isoladas de humanos e animais destacam-se: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* (Weitzman & Summerbell 1995, Larone 1996).

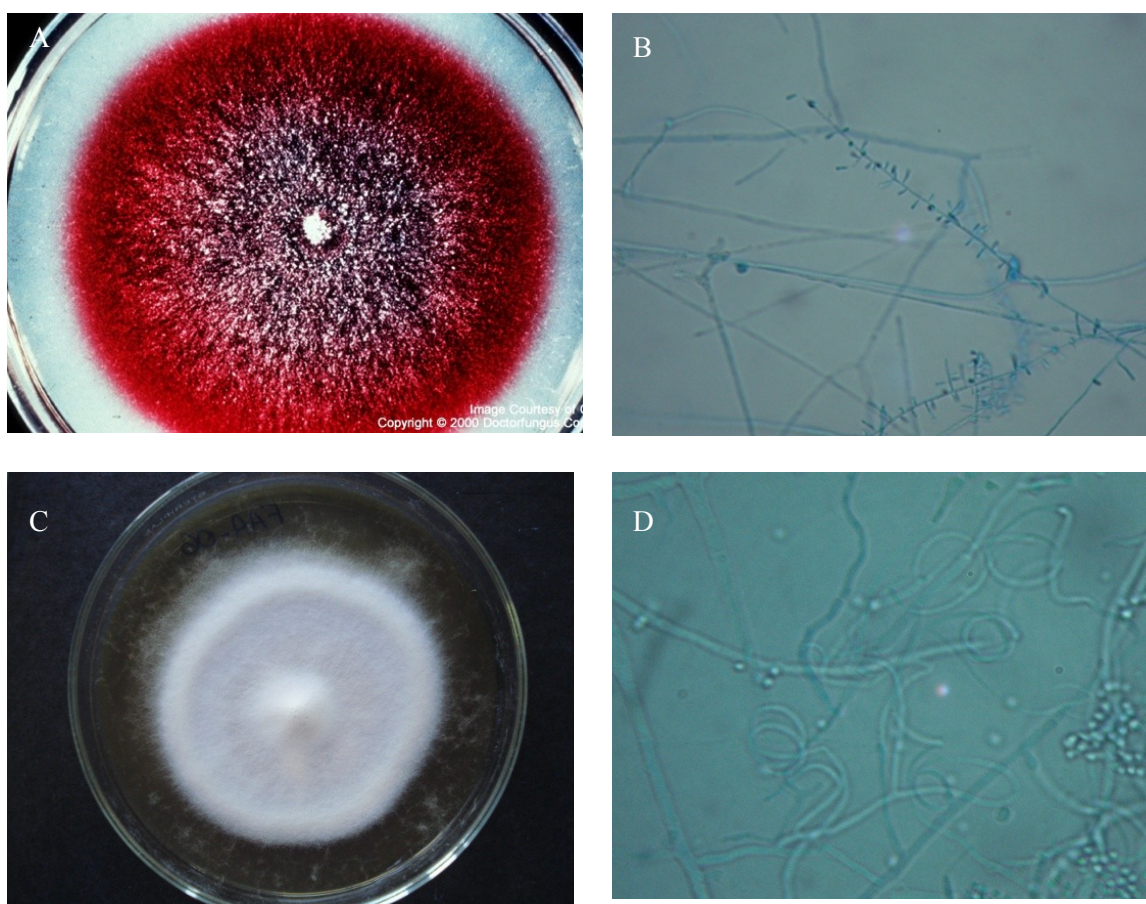


Figura 6: *T. rubrum*. A) Colônia algodonosa de coloração vermelha e centro de cor branca característica da espécie *T. rubrum*, B) Microconídios delicados piriformes e raros macroconídios em forma de clavas alongadas característica da espécie *T. rubrum*. *T. mentagrophytes*. C) Colônia branca pulverulenta com reverso apresentando pigmento castanho característica da espécie *T. mentagrophytes*, D) Numerosos microconídios em cachos e isolados, macroconídios em forma de clava característica da espécie *T. mentagrophytes*. Fonte: Fotos cedidas pelo laboratório de Micologia – IPTSP/ Prof.º Fábio Silvestre Ataídes, www.doctorfungus.org/imagenban).

Os dermatófitos podem ser classificados em antropofílicos, zoofílicos ou geofílicos quanto ao habitat. Os dermatófitos antropofílicos são aqueles adaptados à queratina dos seres humanos, raramente infectam outros animais, os zoofílicos usualmente infectam animais, podendo ocasionalmente produzir lesões em humanos, enquanto os geofílicos estão associados com restos de materiais que contêm queratina de animais como pêlos, cascos, chifres encontrados no solo em fase de decomposição (Weitzman & Summerbell 1995, Mahmoudabadi 2005).

Esses fungos realizam uma reprodução sexuada pela produção de ascos com ascósporos, no entanto no processo de evolução dos fungos que vivem como sapróbios no solo para fungos que parasitam homens e animais, ocorreram mudanças no ciclo de reprodução, observando-se uma diminuição na formação de estruturas de reprodução assexuada e perda do ciclo sexuado (Kushwaha & Guarro 2002).

Os dermatófitos encontram-se distribuídos no mundo (Chinelli et al 2003), no entanto, a frequência dessa micose está relacionada a faixa etária, fatores genéticos, condições bioclimáticas, movimentação ou migração humana, contato com animais domésticos além de acúmulo de indivíduos em áreas fechadas (Foster et al. 2004, Dolenc-Voljec 2005, Woldeamanuel et al. 2005).

Em todo o Brasil tem sido verificada uma alta prevalência de dermatofitose, sendo que a etiologia pode variar nas diferentes regiões geográficas (Ripon et al. 1985, Penna et al. 2006). Na região norte e nordeste do país observa-se grande incidência de *T. tonsurans* e *T. rubrum* (Brilhante et al. 2000, Aquino et al. 2003, Oliveira et al. 2006). Em Brasília, região Centro-Oeste, segundo relato de Reis et al. (1992), a espécie *T. rubrum* representou mais de 50% das espécies isoladas em 3466 pacientes portadores de dermatofitoses, enquanto na cidade de Goiânia (GO), *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram as mais frequentes espécies isoladas (Costa et al. 1999, Costa et al. 2002, Dias et

al. 2003). Da mesma forma nas regiões sul e sudeste do país há o predomínio de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (Mezari 1998, Rubio et al. 1999, Ruiz & Zaitz 2001, Araújo et al. 2003, Chinelli et al. 2003, Rezende et al. 2008).

O tratamento utilizado para as dermatofitoses pode ser feito através de terapia tópica ou oral, podendo ser utilizados derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol), terbinafina, griseofulvina (Fernandéz-Torres 2000, Fernandéz-Torres 2002, Elewski & Tavakkol 2005, Hay 2006, Chen & Sorrel 2007). O critério para a utilização destes antifúngicos depende do sítio anatômico afetado e da espécie envolvida. Dentre as espécies de dermatófitos, *T. rubrum* é muitas vezes refratária ao tratamento e ainda, em alguns casos, tem sido observada resistência dos dermatófitos ao tratamento usual (Mukherjee et al. 2003).

1.2.3 Pitiríase versicolor

A pitiríase versicolor, também conhecida como *tinea versicolor*, é uma micose superficial recorrente, usualmente assintomática, de distribuição mundial, com alta freqüência no Brasil. As lesões são constituídas por placas hipo ou hiperpigmentadas, escamosas e de bordas delimitadas, que podem confluir cobrindo extensas áreas do corpo (figura 7). A região cervical, ombros, tórax são as áreas mais frequentemente afetadas (Aljabre 2003, Aste & Pau 2004). As alterações de pigmentação induzidas pelo agente etiológico da pitiríase versicolor podem ocorrer devido à produção de ácidos dicarboxílicos, que podem ter efeitos citotóxicos direto nos melanócitos. Estes ácidos atuam inibindo a atividade da tirosinase, que está presente no interior dessas células, e é responsável pela síntese de melanina (Romano et al. 2005).



Figura 7: Lesões hipo-pigmentadas de localização torácica característica da pitíriase versicolor (Fonte: www.doctorfungus.org/imagenban).

As espécies de *Malassezia* representadas por leveduras lipodependentes e polimórficas que, em parasitismo, se apresentam como células globosas ou ovais agrupadas e filamentos curtos, septados e irregulares são causadoras de pitíriase versicolor (Oliveira et al. 2002). Essas leveduras fazem parte da microbiota da pele de humanos e de outros animais homotérmicos (Hernadéz et al. 2003, Salah et al. 2005).

O nome *Malassezia*, foi usado pela primeira vez por Malassez em 1874, para descrever células arredondadas e ovais encontradas no estrato córneo de pacientes com pitíriase versicolor (Marcon & Powell 1992). Estes microrganismos são pertencentes à classe Blastomycetes, divisão *Basidiomycota*, família Cryptococcaceae e gênero *Malassezia* (Aspiroz et al. 1997). Até 1995 eram conhecidas três espécies de *Malassezia*: *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis* (Simmons & Guého 1990, Marcon & Powell 1992). Em 1996, Guého et al., descreveram novas espécies, baseando-se em suas características morfológicas, fisiológicas, ultraestruturais e moleculares: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*.

Esses microrganismos são mais comuns na puberdade e em adultos jovens devido à atividade das glândulas sebáceas e pelos crescentes níveis dos hormônios sexuais (Ljubojevic et al. 2002, Ingordo et al. 2003, Quintero et al. 2004, Tarazooie et al. 2004, Salah et al. 2005). Alguns fatores podem interferir na patogenicidade de *Malassezia* spp ocorrendo além de pitiríase versicolor à produção de foliculites, dermatite seborréica, dermatite atópica e até mesmo fungemia (Makimura et al. 2000). Em recém nascidos, crianças e pacientes imunocomprometidos que fazem uso de cateter intravascular esse fungo pode levar a infecções sistêmicas (Fauchet et al. 2004). Condições endógenas relacionadas ao hospedeiro como predisposição genética, hipersecreção sebácea, hiperidrose, imunossupressão adquirida, desordens endócrinas e fatores ambientais, ou seja, exógenos (clima quente e úmido) podem ser relacionadas ao desenvolvimento da doença (Midgley 2000, Hafez et al. 2003, Romano et al. 2005).

Este fungo é visualizado através de exame direto (figura 8), no entanto a cultura deve ser realizada em meio contendo ácidos graxos para que possa haver crescimento do microrganismo. O meio de ágar Dixon modificado é bastante utilizado para cultivo das espécies de *Malazessia*, com exceção da espécie *M. pachydermatis* que não é lipodependente (Guillot et al. 1996, Rosa et al. 2006). A identificação de espécies é feita por meio de provas fisiológicas incluindo a reação da catalase, prova da urease, hidrólise da esculina, assimilação em tweens, coloração de Gram, métodos ultraestruturais e métodos moleculares (Guillot et al. 1996).

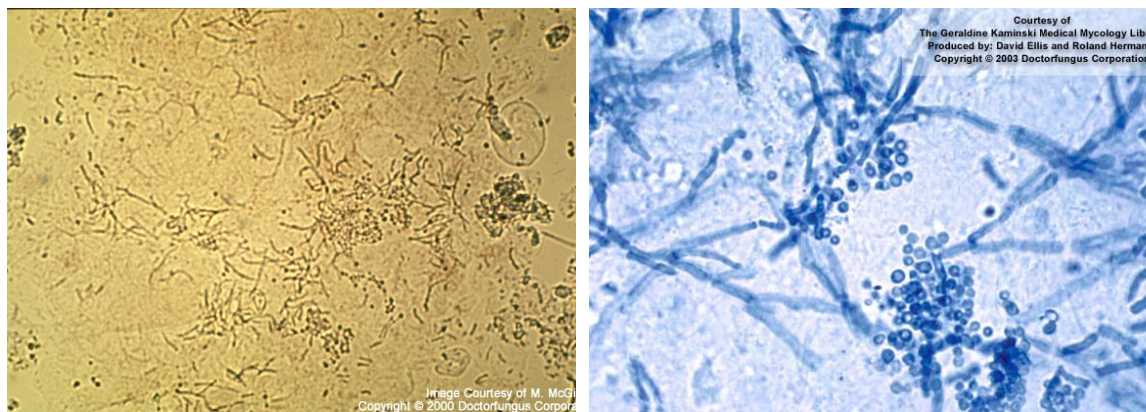


Figura 8: *Malazessia* spp. Filamentos curtos e irregulares e leveduras arredondadas agrupadas A- KOH, B- Tinta Parker (Fonte: www.doctorfungus.org/imageban)

O tratamento pode ser realizado por substâncias específicas e não específicas. Entre os antifúngicos não específicos podem ser utilizados sulfeto de selênio a 2,5%, tiosulfato de sódio 25% + ácido salicílico a 1% e loções de propilenoglicol a 50% (Miranda et al. 2005), que são encontrados sob a forma de loções, cremes ou shampoos (Gupta et al. 2002). Os antifúngicos específicos de uso tópico e oral incluem os derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol), terbinafina e butenafina (Oliveira et al. 2002, Gupta et al. 2004). As lesões de pitiríase são extremamente recidivantes, levando a maioria das vezes a um tratamento de longa duração (Oliveira et al. 2002).

1.3 Antifúngicos

A indústria farmacêutica tem buscado novas alternativas para o tratamento das infecções fúngicas, cuja incidência tem aumentado em decorrência de maior sobrevivência em pacientes imunocomprometidos, ou com doenças crônicas (Catalán & Montejo 2006).

Em 1903, a terapia antifúngica era feita com o iodeto de potássio que se mostrava pouco efetivo e não-específico. Nesse contexto, em 1939 surgiu a griseofulvina, mas só foi usada clinicamente em 1958 em lesões por dermatófitos. Na década de 1950, surgiram os derivados poliênicos, sendo que em 1951 a nistatina começou a ser usada como opção terapêutica para infecções por leveduras (*Candida spp.*). Em 1956, surgiu o primeiro antifúngico realmente efetivo no tratamento de micoses profundas, a anfotericina B. Além disso, em 1964 as micoses profundas ganharam um reforço terapêutico com o surgimento da 5-fluorocitosina. Outros antifúngicos surgiram a partir desta data como descrito na figura 9.

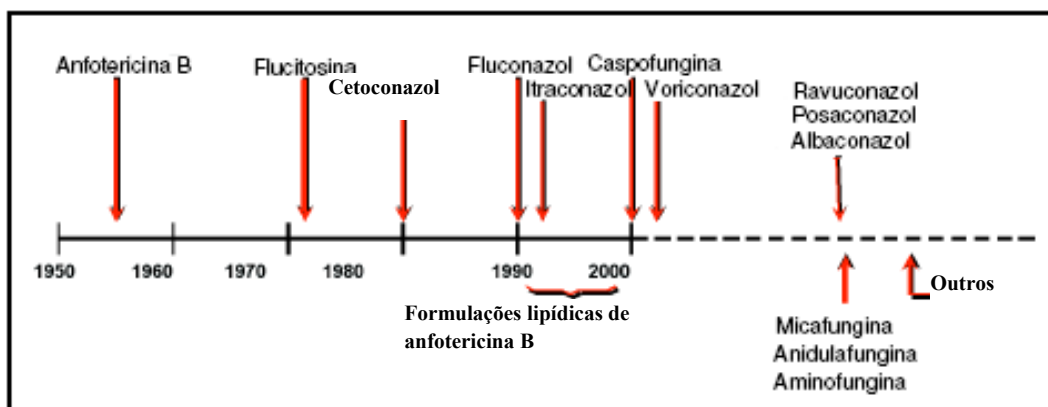


Figura 9: Evolução histórica do surgimento dos principais antifúngicos (Fonte: Catalán & Montejo 2006).

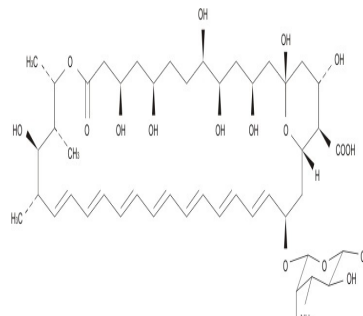
Os antifúngicos podem exercer ações fungistáticas ou fungicidas. Cada um tem características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e/ou sistêmicas, podendo ser classificadas com base no sítio-alvo e estrutura química. A atividade dos antifúngicos ocorre na membrana celular (azóis, anfotericina B e nistatina), na síntese de ácidos nucleicos (fluocitosina e a griseofulvina), ou na formação da parede celular (equinocandinas) (Lacaz & Del Negro 1994, Denning 2003). O esquema de mecanismo de ação de diferentes antifúngicos encontra-se na figura 10.



Figura 10: Mecanismo de ação dos antifúngicos na célula fúngica. (Fonte: <http://analumarienf.blogspot.com>)

Anfotericina B, os derivados azólicos, terbinafina, griseofulvina e 5-fluorocitosina são os antifúngicos mais comumente utilizados para o tratamento das infecções fúngicas.

1.3.1 Anfotericina B



A anfotericina B desoxicolato foi produzida a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus* em meados de 1955 e pertence à ampla família dos macrolídeos poliênicos (Filippin & Souza 2006). A atividade antifúngica da anfotericina B pode ser observada contra *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *C. neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Aspergillus* spp, *Absidia* spp, *Mucor* spp e *Rhizopus* (Catelán & Montejo 2006).

Esse antifúngico atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, alterando sua permeabilidade o que acarreta desequilíbrio osmótico pela perda de íons

intracelulares e conseqüentemente lise e morte das células (Vanden Bossche 1997). Embora dotada de forte ação antifúngica, a anfotericina B também interage com o colesterol da membrana celular de mamíferos acarretando importantes efeitos de toxicidade agudos ou crônicos, como distúrbios renais com a elevação da uréia e creatinina e diminuição do potássio sérico, distúrbios hematológicos como anemia, problemas cardíacos e hepáticos (Meyer 1994, Elewski & Tavakkol 2005).

Na tentativa de reduzir os efeitos colaterais provocados pela anfotericina B foram desenvolvidos complexos lipídicos e as formas lipossomais (Carrillo-Munoz et al. 2006). O complexo lipídico de anfotericina B é uma formulação associada à lípideos (1- α -dimiristofosfatidilcolina, 1- α -dimiristofosfatidilglicerol e anfotericina B) enquanto a anfotericina B lipossomal é constituída por um composto de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diestearoilfosfatidilglicerol e anfotericina B. Esses compostos associados diminuem a toxicidade de anfotericina B pelo fato de apresentarem uma baixa afinidade as células de mamíferos (Carrillo-Muñoz et al. 2001, Hann & Prentice 2001).

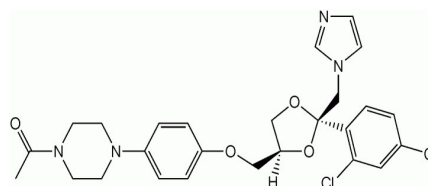
Apesar da toxicidade, a anfotericina B continua sendo a terapia de escolha no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Pauw 2000), embora as formulações lipídicas sejam de 10 a 100 vezes mais caras do que a convencional (Mellado et al. 2003). Em relação à criptococose, esse antifúngico pode ser usado nas diferentes formas clínicas da doença ou seja, no tratamento das lesões pulmonares primárias ou secundárias, nas infecções do sistema nervoso central e ainda na forma disseminada (Ostrosky-Zeichener et al. 2003).

1.3.2 Derivados azólicos

Os derivados azólicos constituem o grupo de antifúngicos mais usados na terapêutica clínica (Chen & Sorrel 2007), sendo constituído por um grupo de compostos sintéticos com estrutura química semelhante e amplo espectro de ação (Azanza et al. 2007).

Os derivados azólicos são divididos em dois grupos em função do número de nitrogênios no anel: imidazólicos, como cetoconazol, miconazol e clotrimazol e os triazólicos como fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, albaconazol, ravuconazol, são importantes opções terapêuticas para várias infecções fúngicas (Tracz & Didomenico 2001, Azanza et al. 2007) (Figura 11). Atuam inibindo a C14 α dimetilase, presente no citocromo P-450 (CYP3A4 e CYP2C9) que acarreta o acúmulo de esteróides metilados e diminuição do ergosterol, principal constituinte da membrana celular, com conseqüente inibição do crescimento da célula fúngica (Georgopapadakow 1998, Catalán & Montejo 2006).

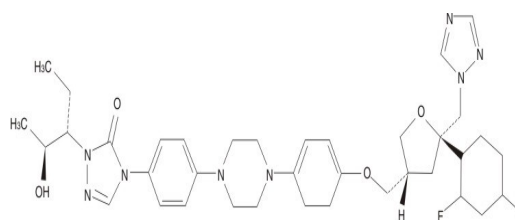
1.3.2.1 Cetoconazol



O cetoconazol é um derivado imidazólico disponível desde 1981, o qual apresenta uma rápida absorção e uma ampla ligação com as proteínas plasmáticas. (Lacaz & Del-Negro 1994). Pode desempenhar uma atividade fungicida ou fungistática, dependendo da concentração utilizada. Efeitos colaterais graves como interferência transitória na síntese dos esteróides androgênicos e adrenais do hospedeiro, produção de distúrbios gastrointestinais como náuseas e vômitos e elevado potencial tóxico quando

em altas dosagens podem ser observados com este medicamento (Terrel 1999, Catalán & Montejo 2006). Em menor proporção, pode ocorrer insuficiência cardíaca congestiva (Ahmad & Beg 2001). Este fármaco é considerado de elevada eficácia no tratamento de infecções superficiais como pitiríase versicolor, mas tem pouca atividade em algumas micoses, pois apresenta uma distribuição limitada no organismo, não atingindo o líquido cefalorraquidiano (LCR) (Gupta et al. 2002, Gupta et al. 2003 b, Shin& Lin 2004).

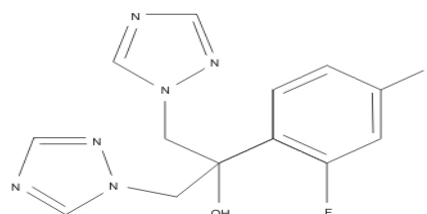
1.3.2.2 Itraconazol



O itraconazol tem um amplo espectro de ação fungicida, utilizado por via oral, com marcante característica lipofílica e queratinofílica, que lhe confere grande afinidade por tecidos como pele, unha e mucosas (Kose et al. 2005).

Esse antifúngico representa uma importante opção no tratamento das dermatofitoses e da pitiríase versicolor (Terrel 1999) e apresentando também atividade para *Candida* sp, *C. immitis*, *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *H. capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* e *Penicillium marneffe* (Corno et al. 1994). Causa, no entanto, efeitos colaterais como dor abdominal, náuseas, constipação, dispepsia, cefaléia e sintomas dermatológicos como rash cutâneo, prurido e urticária (Park et al. 1997, Carrillo-Muñoz et al. 2001). Em altas doses pode provocar hipopotassemia, hipertensão moderada (Catalán & Montejo 2006) e problemas cardíacos (Eggimann et al 2003). Além disso, interações medicamentosas com antidiabéticos orais, fenitoína, anticoagulantes cumarínicos, digoxina, astemizol e ciclosporina têm sido descritas (Carazo et al. 1999).

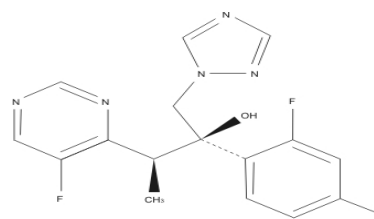
1.3.2.2 Fluconazol



O fluconazol é considerado um fungistático de boa absorção no trato gastrointestinal, com baixa ligação com as proteínas plasmáticas, atingindo nível terapêutico em determinados fluidos orgânicos, como líquido e humor aquoso, sendo distribuído a todo o organismo, podendo chegar até mesmo ao sistema nervoso central (Andriole 1998, Eggimann et al. 2003). Está disponível para administração intravenosa e oral, sendo que a absorção independe da acidez gástrica.

O fluconazol tem sido sugerido como opção no tratamento da pitiríase versicolor (Gupta et al. 2002), com boa atividade para *C. neoformans* (Sharon et al. 2007), *P. brasiliensis*, *C. immitis* e *Candida spp* (Mellado et al. 2003). Alguns efeitos colaterais como cefaléia, náusea, exantema e dor abdominal têm sido descritos (Martin 1999). Síndrome de Stevens-Johnson em pacientes com AIDS e câncer podem ser desencadeados pelo seu uso (Catalán & Montejo 2006).

1.3.2.3 Voriconazol



O voriconazol é um produto derivado do fluconazol, disponível no mercado desde 2002, sendo encontrado na forma oral e intravenosa com biodisponibilidade de 90 % (Catalán & Montejo 2006). Esse antifúngico atua inibindo além das isoenzimas CYP3A4 e CYP2C9, a 24-metileno dihidrolanosterol dimetilase, o que o diferencia do fluconazol (Canuto & Roteró 2002).

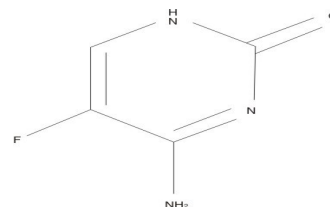
Tem amplo e potente espectro de ação para *C. neoformans*, dermatófitos, *Candida* spp, *Malazessia* spp, *Trichosporon* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp, *Histoplasma* spp, *Blastomyces* e *C. immitis* (Jonhson & Kauffman 2003, Maertens 2004, Morera et al. 2005).

Embora de uso recente, alguns efeitos colaterais como elevação das transaminases, rash cutâneo e distúrbios visuais e gastrointestinais são relatados com o uso prolongado deste medicamento (Sabo & Abdel-Rahmanl 2000, Kauffman et al. 2006). Interações medicamentosas são observadas com o uso de ciclosporina, rifampicina, fenitoína, carbamazepina, ritonavir e barbitúricos (Petrikkos & Skiada 2007).

1.3.2.4 Novos derivados azólicos

Os triazólicos ravuconazol, posaconazol e albaconazol são de uso recente, mostrando-se ativos para o tratamento de várias infecções fúngicas (Brega et al. 2000, Arikan & Rex 2002, Herbrecht 2004, Catalán & Montejo 2006). Devido ao pouco tempo de disponibilidade no mercado ainda não foram descritos efeitos indesejáveis com o uso destes fármacos.

1.3.3 5-Fluorcitosina

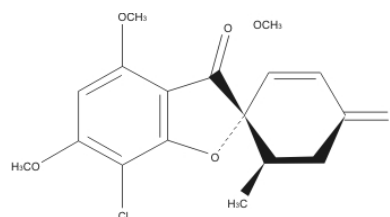


A 5-fluorcitosina é uma pirimidina fluorada sintética, inicialmente desenvolvida como um medicamento anticancerígeno (Odds 2003), cujo mecanismo de ação está relacionado com a conversão da 5-fluorcitosina em 5-fluorouracil, bloqueando a síntese de proteínas (Eggmann et al. 2003). Há fortes indicações de que os fungos

podem adquirir resistência a este antifúngico, por isto tem sido constantemente associado à anfotericina B. Esta associação permite reduzir a dosagem de anfotericina B no tratamento de diferentes micoses sistêmicas, havendo conseqüentemente uma redução dos efeitos tóxicos causados pela anfotericina B (Quindós et al. 2004).

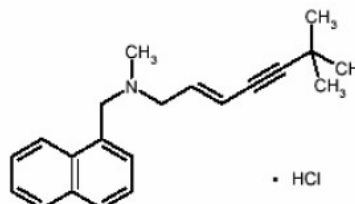
Distúrbios gastrointestinais são comuns no uso deste fármaco, embora também possa ocorrer hepatotoxicidade, eosinofilia, leucopenia, trombocitopenia e exantema (Catalán & Montejo 2006, Sharon et al. 2007).

1.3.4 Griseofulvina



A griseofulvina é um fungicida que rompe o fuso mitótico da célula fúngica impedindo a sua multiplicação celular (Elewski & Tavakkol 2005). Este antifúngico apresenta atividade para diferentes espécies de dermatófitos, podendo ser indicado para tratamento de micoses causadas por *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. audouinii*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum* (Gupta & Del Rosso 2000). Os efeitos colaterais incluem náuseas, rash cutâneo em 8 a 15% dos pacientes, além de ser contra-indicado para mulheres grávidas devido ao seu mecanismo de ação no fuso mitótico celular, podendo ocasionar teratogênese (Hale et al. 2002, Elewski & Tavakkol 2005).

1.3.5 Terbinafina



Substância pertencente à classe da alilaminas, a terbinafina atua inibindo a enzima epoxidase, importante na biossíntese do ergosterol da membrana citoplasmática

fúngica (Lebwohl et al. 2001, Nakano et al. 2006). Devido a sua natureza lipofílica e queratinofílica, acumula-se no extrato córneo lipofílico, glândulas sebáceas e folículos pilosos, sendo registrada uma boa absorção nestes tecidos (Gupta et al. 2003 a, Gupta et al. 2003 b). Devido a esta propriedade seu uso tem sido largamente difundido para tratamento de onicomicose, infecção de difícil terapêutica devido à reduzida absorção dos outros fármacos (Elewski & Tavakkol 2005). O uso de terbinafina pode acarretar efeitos colaterais que incluem os distúrbios gastrointestinais como náuseas, diarreia e dor abdominal e, além disso, ocasionar efeitos cutâneos importantes como rash cutâneo (Smith et al. 2000).

1.4 Plantas medicinais e seus produtos naturais

O uso de plantas no tratamento de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana, existem vários registros históricos sobre a utilização das plantas para o tratamento de doenças desde 4000 a.C (Helfand 1990). Povos como os chineses, árabes, caldeus, egípcios, incas e muitos outros dominaram os segredos da ação das plantas sobre o organismo humano. Os egípcios documentaram em papiros o uso de aproximadamente 700 produtos extraídos de plantas. Na Índia, 1000 a.C, foram registradas mais de 1000 ervas, muitas delas ainda em uso pela medicina Ayurvedica (Phillipson 2001). Por volta de 1970, a Organização Mundial de Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa, baseada em extratos de plantas, onde surgem pesquisas e desenvolvimento de medicamentos obtidos de fontes naturais (Sixel & Pecinalli 2002, Newman et al. 2003). No fim do século XIX e início do século XX foram isolados os primeiros compostos de produtos vegetais, incluindo alcalóides como morfina, estricnina e quinina (Hamburger & Hostettmann 1991, Phillipson 2001).

Atualmente, as plantas medicinais ainda são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais em todas as regiões do país e até mesmo nas grandes cidades e são utilizadas para tratar e prevenir doenças (Dourado et al. 2005, Moraes et al. 2005). Os constituintes das plantas como as raízes, caules, folhas e frutos, para uso medicinal são, em algumas comunidades, as únicas fontes disponíveis de recursos terapêuticos (Luna et al. 2005, Ruiz et al. 2005). As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, mantendo o hábito do consumo dessas preparações naturais.

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento desses microrganismos (Sartori 2005). No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos (1948), avaliando extratos de 100 diferentes plantas indicadas como antiinflamatórias ou cicatrizantes.

Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os metabólitos secundários que são elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, taninos e terpenóides (Cowan 1999, Duarte 2006). Os compostos fenólicos, alcalóides e flavonóides e os terpenos são ativos contra vírus, bactérias e fungos. Os terpenóides, divididos em diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), hemiterpenos (C_5) e sesquiterpenos (C_{15}) são

largamente utilizados em fungos, pela ação de rompimento da membrana lipídica do microrganismo (Cowan 1999).

A biossíntese desses compostos pode sofrer influência de fatores como clima, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrição, altitude, poluição atmosférica, tipo de solo, índice pluviométrico e época de coleta, bem como a idade e o desenvolvimento da planta (Filho & Yunes. 1998, Gobbo-Neto & Lopes 2007). A concentração dos constituintes ativos e a proporção relativa dos componentes da mistura dos metabólitos secundários podem sofrer influência de todos estes fatores (Gobbo-Neto & Lopes 2007). Os fatores expostos associados às condições de coleta, estabilização e estocagem dos produtos, podem afetar o conteúdo final dos metabólitos secundários e conseqüentemente no valor terapêutico de preparados medicinais (Calixto 2000).

A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais (de caules, raízes, folhas e frutos), tem sido objeto de incessantes estudos (Maciel et al. 2002).

1.5 Plantas medicinais do cerrado

Considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, o Brasil possui seis biomas ricos em espécies medicinais: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Floresta Atlântica, Pantanal e Floresta Subtropical (Vieira & Martins 1998, Rehder et al. 2004). O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro com uma área de aproximadamente dois milhões de km², correspondendo a 24% do território nacional, superado em área apenas pela floresta Amazônica e abriga uma imensa diversidade biológica (figura 12) (Ratter et al. 1997, Klink & Machado 2005).



Figura 12: Distribuição do cerrado brasileiro (Fonte: Ratter et al. 2007)

Já foram registradas no Cerrado brasileiro, aproximadamente, 10.000 espécies de plantas, 837 espécies de aves, 161 espécies de mamíferos, 150 espécies de anfíbios e 120 espécies de répteis (Myers et al. 2000, Silva & Bates 2002). Muitas das plantas do cerrado brasileiro têm sido utilizadas na medicina popular no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas além de analgésicos, tranqüilizantes, diuréticos e laxativos (Lima et al. 1992, Almeida et al. 1998, Vieira & Martins, 1998, Alves et al. 2000, Duarte et al. 2005, Domingues Souza & Felini 2006, Fener et al. 2006).

Prévios estudos foram realizados em nosso laboratório (Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás) verificando a atividade antifúngica de diferentes plantas (famílias Caryocaraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Labiatae, Apocynaceae, annonaceae) e seus componentes.

Importante espécie do gênero *Caryocar*, *Caryocar brasiliensis* Camb, planta da família Caryocaraceae, com nome popular pequi, bastante difundida em decorrência do uso de seu fruto na culinária regional, é largamente utilizada como tonificante, no tratamento de bronquites, gripes, resfriados e como expectorante

(Oliveira et al. 1968). Estudos *in vitro* têm demonstrado que o óleo essencial dessa planta foi capaz de inibir o crescimento de fungos causadores de doenças sistêmicas como *Paracoccidioides brasiliensis* e *C. neoformans* (Passos et al. 2002, Passos et al. 2003).

Plantas do gênero *Eugenia*, pertencentes à família Myrtaceae têm seu uso medicinal baseado nos efeitos purgativos dos frutos, sendo a “garrafada” das folhas utilizadas como antidiarréicos e no combate a problemas cardíacos (Ferreira 1980). É bastante conhecido que *E. uniflora* L. (pitanga) apresenta propriedades antimicrobianas contra dermatófitos e *Candida* spp (Adebajo et al. 1989; Schapoval et al. 1994, Souza 2002). Testes *in vitro* demonstraram atividade antifúngica do óleo das folhas de *E. dysenterica* D.C. (cagaita), que se mostrou capaz de inibir o crescimento de fungos como *C. neoformans* (Costa et al. 2000).

As plantas do gênero *Hyptis*, pertencente à família Lamiaceae, apresentam propriedades citotóxicas, antifúngicas, anti-reumáticas, antiinflamatórias, anti-hepatotóxicas e antimaláricas (Yamagishi et al. 1988, Pereda-Miranda & Delgado, 1990, Almtorp et al. 1991). Das substâncias isoladas de *Hyptis*, os lignóides foram identificados como os responsáveis pela atividade antitumoral e antimetabólica (Kingston et al. 1979); enquanto os compostos da classe dos flavonóides, apresentaram atividade antimicrobiana e citotóxica (Craveiro 1981). O óleo essencial de *H. suaveolens* possui atividade inibitória sobre bactérias e fungos da espécie *C. albicans* (Asekum et al. 1999). Atividade antifúngica *in vitro* do extrato etanólico e óleo essencial de *H. ovalifolia* Benth. sobre *C. neoformans* e dermatófitos foi observada por Paula et al. (2001), Souza et al.(2002) e Souza et al. (2003).

Ocimum gratissimum L. conhecida por alfavaca, alfavacão, favacão, alfavaca-cravo, pertencente à família *Labiatae* (Vieira 1999), pode ser usado como antitérmico,

antiparasitário, laxante, descongestionante nasal, no combate a infecções vaginais e contra queda de cabelo (Lima et al. 1992, Offiah & Chikwendu 1999). A atividade antifúngica do óleo essencial de eugenol de *O. gratissimum* contra fungos patogênicos como *C. neoformans* e dermatófitos foi demonstrada (Lemos et al. 2005, Silva et al. 2005).

Annona crassiflora Mart pertencente a família Annonaceae destaca-se pelo sabor de seus frutos, que são muito apreciados. Os frutos do araticunzeiro podem ser consumidos *in natura*, como também utilizados na fabricação de compotas, doces, geléias, sorvetes, sucos, licores e vinagres. Essa planta tem valor ornamental e medicinal, sendo empregada popularmente como antidiarreicas (sementes) e como antimicrobiana (Almeida 1998). Silva et al. (2001) demonstrou a atividade antifúngica *in vitro* do extrato da folha de *Annona crassiflora* contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Aspidosperma ramiflorum Muell. Arg. (Apocynaceae), conhecida como “guatambu, guatambu-amarelo, guatambu-grande, peroba-amarela, peroba-café ou tambu”, é uma planta nativa do sudeste do Brasil (Ferreira et al. 2004) possui atividade inibitória sobre o crescimento de espécies de *Leishmania* e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Ferreira et al. 2004, Oliveira 1999). Souza et al. (2006) também verificaram que esta planta possui ação antifúngica contra fungos do gênero *Cryptococcus* e dermatófitos.

Neste trabalho, o gênero *Hymenaea*, família Fabaceae, será estudado com relação às suas propriedades antifúngicas.

1.5.1 Gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea* é pertencente à família *Leguminosae* (*Fabaceae*), subfamília *Caesalpinieae*, com nome popular de jatobá, é originário da língua tupi, cujo significado é “arvore de fruto duro”. A palavra *Hymenaea* deriva do grego “*Hymen*” e significa “deus das uniões” (Barroso et al. 1991). Esta planta é originária da África (Lee & Langenheim 1975) e pode ser encontrado no México, Cuba e América do Sul, sendo de grande distribuição no cerrado brasileiro (Minas Gerais, Bahia, Goiás e Tocantins) e na floresta Amazônica (Lorenzi 1992, Silva et al. 1994, Petitt et al. 2001).

Aproximadamente 25 espécies do gênero *Hymenaea* foram descritas como originadas do continente americano, a maioria com madeira de alto valor comercial. No Brasil verifica-se a presença de 13 espécies: *Hymenaea altíssima* Ducke, *Hymenaea capanema* Ducke, *Hymenaea chapadensis* Barb. Rodr, *Hymenaea correana* Barb Rodr, *Hymenaea coubaril* L, *Hymenaea eriogyne* Benth, *Hymenaea intermédia* Ducke, *Hymenaea martiana* Hayne, *Hymenaea rubiflora* Ducke, *Hymenaea splendida* Vog, *Hymenaea stignocarpa* Mart Ex Hayne, *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, *Hymenaea velutina* Ducke (Lee & Langenheim 1975, Correa 1984, Rizzini 1985, Mackinder 2005).

O jatobá é uma árvore grande, com 15 a 20 metros de altura (podendo chegar até 20-40 metros na região Amazônica), possui tronco reto, com cerca de 2 metros de diâmetro, copa arredondada com folhagem densa e casca espessa de até 3 centímetros. A casca externa tem cor cinza-clara com pequenos sulcos e espessura de até 10 mm e a casca interna é rosada apresentando uma resina cor de vinho (figura 13), ocorrendo freqüentemente em solos argilosos e pobres (Lorenzi 1992, Shanley & Medina 2005). Por sua beleza tem sido largamente utilizada na arborização de cidades (Almeida 2001).

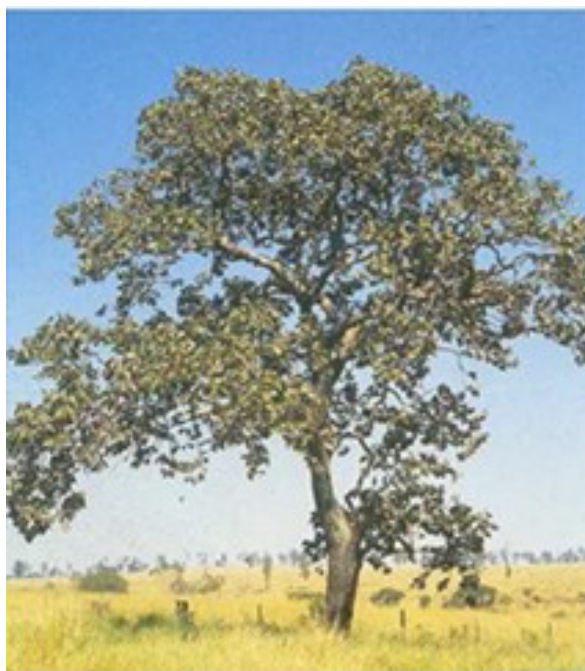


Figura 13: Árvore do jatobá (Fonte: Lorenzi 1992)

Essa planta produz madeira de alto valor comercial, com excelente aceitação no mercado externo pela sua durabilidade, sendo utilizada na construção civil (Granato et al. 2005, Shanley & Medina 2005). A resina da madeira, chamada de jutaicica, é utilizada na indústria e na área farmacêutica (Almeida et al. 1998) sendo normalmente encontrada no pé da árvore, escorrida das “feridas” abertas pelos insetos na casca do tronco e é um excelente impermeabilizador natural (Shanley & Medina 2005). Os frutos dessa árvore, de sabor adocicado, aspecto farináceo e cheiro característico, possuem elevado teor de fibra alimentar e são utilizados na alimentação humana e animal e possuem um alto teor de cálcio e magnésio (Corrêa 1984, Silva et al. 2001). A polpa dos frutos é bastante apreciada na culinária regional, produzindo uma farinha que é utilizada para elaboração de bolos, pães, biscoitos e mingaus (Almeida 1998) (Figura 14).

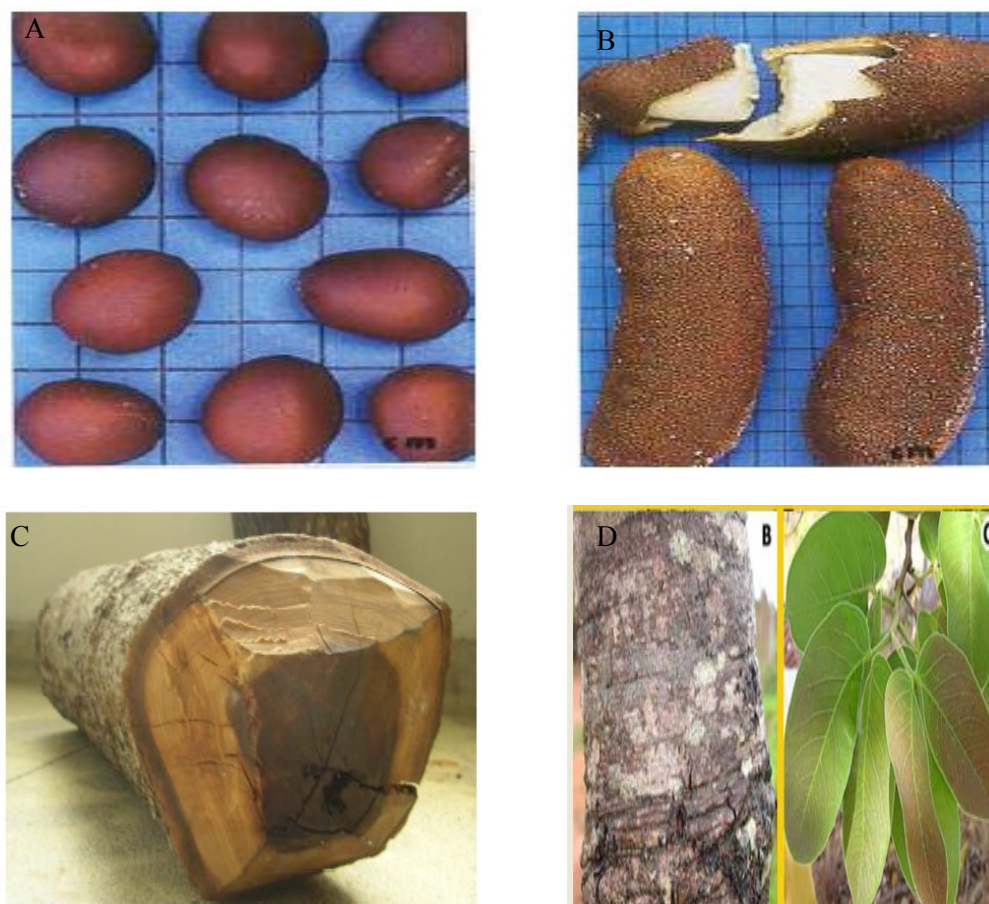


Figura 14: Sementes (A), frutos (B), madeira (C), folhas e casca (D) do jatobá (Fonte: www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatobá)

O gênero *Hymenaea* é utilizado na medicina popular no tratamento de hemoptises, infecções pulmonares, problemas estomacais, asma, laringites, hematúria, diarreia, fraquezas em geral e ação hipoglicemiante (Verpoorte 1987, Vila Verde et al. 2003, Gazzaneo et al. 2005, Shanley & Medina 2005, Agra et al. 2007). Os principais constituintes dessa planta são os terpenos, detectados na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca (Nogueira et al. 2001) além de taninos e fenóis (Caramori et al. 2004) (figura 15).

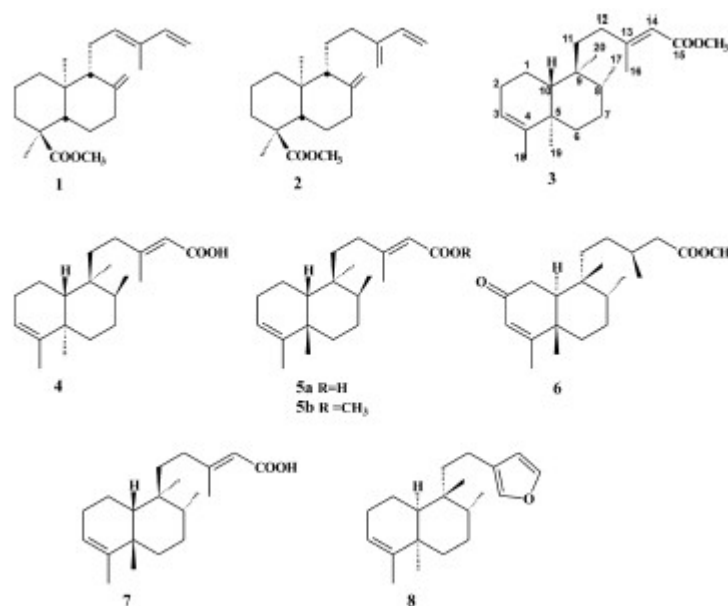
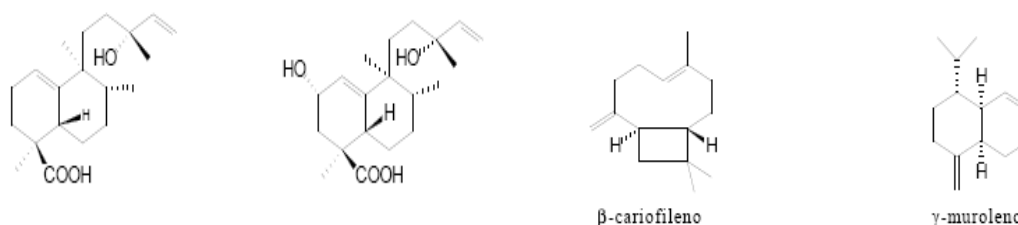


Figura 15: Estrutura de diterpenóides encontrados em *Hymenaea* sp.(Fonte: Nogueira et al. 2001)

As espécies *H. coubaril*, *H. stilbocarpa* e *H. stignocarpa* são as mais estudadas até o momento. A maioria dos trabalhos publicados relata a presença de terpenos, oligossacarídeos e polissacarídeos isolados das sementes e folhas de *H. coubaril* (Marsaioli 1975, Busato et al. 2001), de flavonóides em *H. stilbocarpa* e de sesquiterpenos em *H. stignocarpa* (Giacomini et al. 2000, Barbosa et al. 2002). Atividade antimicrobiana devido à presença destes compostos tem sido observada nestas três plantas (Fernandes et al. 2005, Gonçalves et al. 2005, Shanley & Medina 2005). Diterpenos e sesquiterpenos são encontrados nas folhas, galhos e troncos de *H. coubaril* e *H. stignocarpa* (Figura 16) (Cunningh et al. 1974, Valentim 2006).



A) Estruturas de diterpenos do tipo halimadieno de *H. coubaril*

B) Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de *H. stignocarpa*

Figura 16: Estruturas isoladas de *H. coubaril* e *H. stignocarpa* (Valentim 2006).

Hymenaea martiana Hayne conhecida como “jatobá ou jatobá-da-mata” é uma planta característica do cerrado de grande valor econômico, sendo a sua madeira considerada como “madeira vermelha” (Instrução Normativa 2008). O seu uso na medicina popular é bastante conhecido, sendo que o extrato alcoólico de *H. martiana* tem sido usado no tratamento de inflamações e de reumatismo e ainda como antinoceptiva e analgésica (Neves et al. 1993, Gazzaneo et al 2005). Da casca de *H. martiana* foi isolado um flavonóide “astilbina” (figura 17) que apresenta atividade antioxidante e hepatoprotetora (Closa et al. 1997).

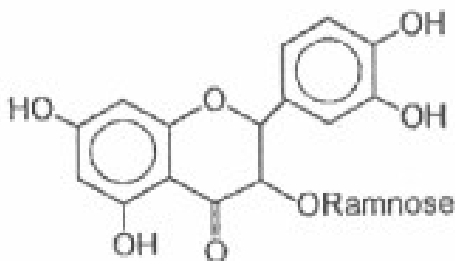


Figura 17: Estrutura química da astilbina isolada de *H. martiana* (Fonte: Filho & Yunes 1998).

Diante do exposto, baseados na ação antimicrobiana apresentada pelo gênero *Hymenaea*, neste trabalho, foi verificada a atividade antifúngica de *H. martiana*.

1.6 Testes de suscetibilidade

Diversos métodos *in vitro* são utilizados para avaliar a suscetibilidade dos fungos aos diferentes antifúngicos. As técnicas disponíveis para a realização dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos consistem em adaptações executadas aos agentes antibacterianos, e normalmente não são utilizados como rotina nos laboratórios de micologia.

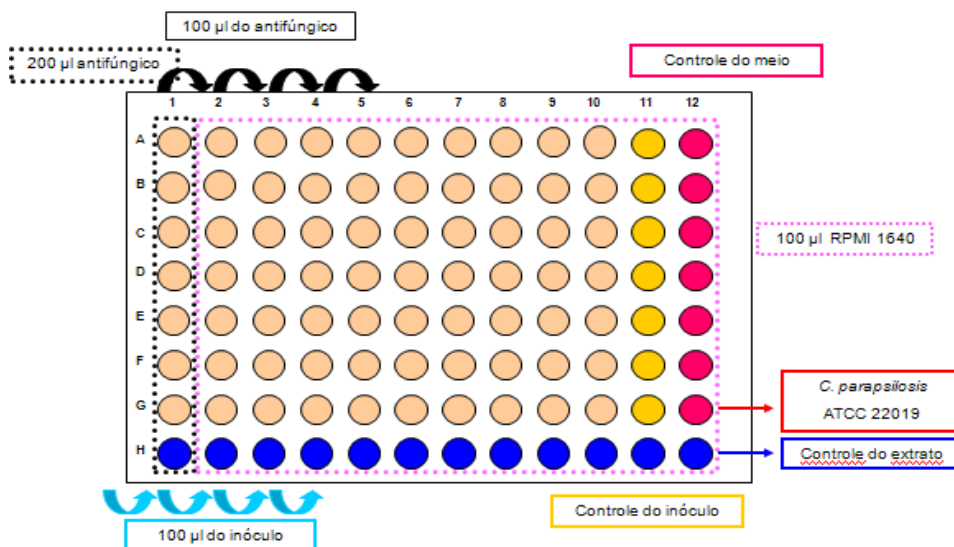
Diante da comprovada eficácia de várias plantas medicinais no tratamento de infecções fúngicas e aumento de pesquisas para comprovar esse fato, metodologias foram desenvolvidas para avaliar a atividade antifúngica frente a produtos naturais. No

entanto, até o momento, não há consenso entre os pesquisadores sobre testes de suscetibilidade com extratos de plantas. A metodologia padrão para testes com produtos naturais para a determinação da atividade antifúngica é variável entre os vários pesquisadores.

O método de difusão em ágar fornece um resultado qualitativo e é usado na triagem de plantas para observar atividade antimicrobiana. Este método não é apropriado para o estudo de atividade de amostras polares, ou seja, aquelas que não se difundem facilmente no ágar (Cos et al. 2006). De acordo com o tamanho do halo de inibição observado, os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes (Karamn et al. 2003, Springfield et al. 2003).

O método de bioautografia é uma variação da metodologia de difusão em ágar, fornecendo resultados qualitativos e, analisa a atividade antimicrobiana em placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Cos et al. 2006). O método é eficiente na busca rápida por novos agentes antimicrobianos por meio do isolamento biomonitorado, no entanto compostos que mostram baixa difusão em ágar não podem ser detectados (Fennell et al. 2004).

Os métodos de diluição fazem uma avaliação quantitativa dos compostos. Comparando os resultados de variados tipos de testes, o método de microdiluição em caldo foi o que apresentou uma maior sensibilidade, é um método quantitativo através do qual é possível detectar a concentração inibitória mínima (CIM), informação importante para avaliar a atividade de substâncias químicas visando a produção de um novo agente antifúngico (Scorzoni et al. 2007). O teste de microdiluição nesse trabalho foi realizado conforme mostra o esquema 1.

Esquema 1: Teste de suscetibilidade *in vitro* por microdiluição em caldo

Apesar das inúmeras pesquisas em busca de novas substâncias antifúngicas, não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais. Aligianis et al. 2001, propuseram uma classificação para materiais vegetais com base em resultados de CIM, considerando como: forte inibição CIM até 500 µg/mL, inibição moderado entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição acima de 1600 µg/mL. Para Scorzoni et al. 2007, a CIM para extratos de plantas de até 250 µg/mL pode ser considerado como ativa; ou seja, apresenta uma considerável inibição, o qual deve ser estudada para posterior análise de uso em terapêutica.

Justificativa

A alta prevalência de infecções fúngicas em humanos e a problemática causada pelo uso dos antifúngicos tradicionais, que apresentam um alto custo, elevada toxicidade além de relatos de resistência fúngica a esses medicamentos, torna-se importante o desenvolvimento de agentes antifúngicos mais ativos, mais seguros e com uma menor quantidade de efeitos colaterais. O cerrado brasileiro tem uma flora bastante diversificada com plantas utilizadas na medicina popular para infecções microbianas. Plantas do gênero *Hymenaea* são usadas pela população em processos inflamatórios, infecções bacterianas, reumatismo e anemias. *Hymenaea martiana* conhecida como “jatobá” é nativa da América do Sul, México e Cuba, sendo que no Brasil pode ser encontrada no cerrado goiano. Embora propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diferentes plantas já tenham sido estudadas, a atividade antifúngica de *H. martiana* sobre *C. neoformans*, *Malassezia* e dermatófitos ainda não foi estabelecida.

O método de microdiluição em caldo padronizada para leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* (M27-A2) e para fungos filamentosos (M38A) com modificações para dermatófitos é eficaz para determinação da suscetibilidade *in vitro* para plantas e seus extratos. Neste trabalho através desta metodologia, os extratos de *H. martiana* foram testados para verificação da sua atividade sobre *C. neoformans*, *Malassezia* e dermatófitos.

Objetivos

1.7 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de *Hymenaea martiana* Hayne.

1.8 Objetivos específicos

1- Determinar a concentração inibitória mínima de extrato bruto e frações hexânica, éter etílica, metanólica, butanólica e hidrometanólica de *H. martiana* sobre isolados de *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia sp* e dermatófitos através da técnica de microdiluição em caldo.

Referências bibliográficas

- ADEBAJO AC, Oloke KJ, Aladesanmi AJ 1989. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia* 60: 451-455.
- AGRA MF, Freitas PF, Barbosa Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacognosia* 17: 114-140.
- AHMAD I, Beg AZ 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant huma pathogens. *J Ethnopharmacology* 74: 113-123.
- ALIGIANNIS N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agricultural food chem* 40: 4168-4170.
- ALJABRE SHM 2003. Intertriginous lesions in pityriasis versicolor. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17: 659-662.
- ALMEIDA SPA, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina. *Embrapa - CPAC* 464p.

- ALMEIDA SPA 2001. Árvores fruteiras nativas do Cerrado com potencial para arborização urbana, Brasília, DF. Resumos, IX Encontro nacional de arborização humana. Livro de resumos 18 p.
- ALMTORP GT, Hazell AC, Torssel KBG 1991. A lignan and pyrone, and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* 30: 2753-2756.
- ALVES TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EF, Smânia Jr A, Zani CL 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
- ANDRIOLE VT 1998. Current and future therapy of invasive fungal infections. In: Remington J, Swartz M, Malden MA. Current clinical topics infect dis. Ed. *Blackwell Sciences* 18:19-36.
- AQUINO PMLP, Lima EO 2002. Estudo retrospectivo de 145 casos de Tinea capitis na população de João Pessoa-Paraíba. *Rev Bras Anal Clin* 34: 229-231.
- AQUINO PMLP, Lima EO, Farias NMP 2003. Tinea capitis em João Pessoa: visão socioeconômica. *An Bras Dermatologia* 78: 713-717.
- ARAÚJO AJG, Bastos OMP, Souza MAJ, Oliveira JC 2003. Ocorrência de onicomicoese em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *J Bras Dermatol* 78: 299-308.
- ARIKAN S, Rex JH 2002. Ravuconazole Eisai/Bristol-Myers Squibb. *Curr Opin Investig drugs* 3: 555-561.
- ASEKUN OT, Ekundayo O, Adeniyi BA 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia* 70: 440-442.
- ASPIROZ MC, Moreno LA, Rubio MC 1997. Taxonomy of *Malassezia furfur*: state of art. *Rev Iberoam de Micol* 14 :147-149

- ASTE N, Pau M 2004. Pityriasis versicolor on the groin mimicking erythrasma. *Mycoses* 47: 249-251.
- AZANZA JR, Garcia-Quetglas E, Sádaba A 2007. Farmacologia de los azoles. *Rev Iberoam Micol* 24: 223-227.
- BARBOSA MPC, Martins MCC, Aidar M 2002. Estudo químico e avaliação de atividade biológica de folhas de *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang. *Soc Bras Química*, 30º reunião
- BARONI FA 2001. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. (Tese de Doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- BARROSO GM 1991. Sistemática de angiosperma do Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária.
- BARRY LH 2003. Dermatophyte Infections. *American Family Physician* 1: 101-108.
- BREGA EF, Gonzalez G, Fothergill W 2000. An *in vitro* evaluation of new triazole antifungal agents against clinical isolates of dermatophytes in comparison with terbinafine, itraconazole and fluconazole. *40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 17–20.
- BRILANTE RSN, Paixão GC, Salvino LK, Diógenes MJN, Bandeira SP, Rocha MFG, Santos JBF, Sidrim JJC 2000. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da Tinea capitis. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 417-425.
- BUSATO AP, Vargas-Rechia CG, Reicher Fany 2001. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea coubaril*. *Phytochemistry* 58: 525-553.

- CALIXTO JB 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *J Med Biol Res* 33: 179-189.
- CANUTO MM, Rodero FG 2002. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2: 550-563.
- CARAMORI SS, Lima CS, Fernandes KF 2004. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian savannas. *Braz Arch Biol Technol* 47: 253-259.
- CARAZO JLS, Losada LO, Sanjuán VP 1999. Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Rev Iberoam Micol* 16: 26-30.
- CARDOSO HT, Santos ML 1948. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. *Rev Bras Med São Paulo* 62: 67-70.
- CARRILO MUNOZ AJ, Brió S, Quindós G 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 18: 2-5.
- CARRILLO-MUÑOZ AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G 2006. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioterap* 19: 130-139.
- CATALÁN M, Montejo JC 2006. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. *Rev Iberoam Micol* 23: 39-49.
- CHEN SC, Sorrel TC 2007. Antifungal agents. *Med J Aust* 187: 404-409.
- CHINELLI PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins JEC 2003. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 259-263.
- CLOSA D, Torres M, Hoter G, Bioque G, León OS, Gelpí OS, Roselló-Catafau J 1997. Prostanoids and free radicals in CL4C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids* 56: 331-334.

- CORNO JA, Dismukes WE 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 330: 263-272.
- CORREA MP 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, IBDF, 4: 500-503.
- COS P, Vlietinck AJ, Beghe DV, Maesa L 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 106: 290-302.
- COSTA M, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos JA, Oliveira Júnior JG, Silva MRR 2002. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 19-22.
- COSTA TR, Costa MR, Silva MV, Rodrigues AB, Fernandes OFL, Soares AJ, Silva MRR 1999. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 367-371.
- COSTA TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião IM, Ferri PH, Paula JR, Ferreira HD, Sales BHN, Silva MRR 2000. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J Ethnopharmacol* 72: 111-117.
- COWAN MM 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- CRAVEIRO AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matios FJA, Alencar JW, Machado MIL 1981. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: Edição UFC; 150 p.
- CUNNINGH A, Martins SS, Langenheim JH 1974. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in trunk resin of Amazonian *Hymenaea Coubaril*. *Phytochemistry* 13:256.
- DENNING DW 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362: 1142-1151.

- DIAS T, Fernandes OFL, Soares AJ, Passos XS, Costa M, Souza LKH, Silva MRR 2003. Tinha do couro cabeludo em crianças de Goiânia, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 53-655.
- DOERING TJ 2000. How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol* 8: 547-553.
- DOLENC-VOLJC M 2005. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia 1995-2002. *Mycoses* 48: 181-186.
- DOMINGUES SOUZA C & Felfili JM 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 135-142.
- DOURADO ER, Doca KNP, Araujo TCC 2005. Comercialização de plantas medicinais por 'raizeiros' na cidade de Anápolis – GO. *Rev Elet Farmacia* 2: 67-69.
- DUARTE MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Dermelina C 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 97: 305-311.
- DUARTE MCT 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Construindo a história dos Produtos Naturais* 7: 1-16.
- EGGIMANN P, Garbino J, Pittet D 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 3: 772-785.
- ELEWSKI B, Tavakkol A 2005. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 1: 299-306.
- FARIA MR, Magalhães BP 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Rev Biotecnol Ciência Desenvolvimento* - nº 22.

- FAUCHET NC, Botterel F, Legrand P, Guillot J, Bretagne S 2004. Frequency of intravascular catheter colonization by *Malassezia* spp. In adult patients. *Mycoses* 47: 491-494.
- FENER R, Betti AH, Mentz S, Rates MK 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz J Pharm Sci* 42: 369-394.
- FENNELL CW, Lindsey KL, MCGAWB LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, Grace OM, Van Staden J 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J Ethnopharmacol* 94: 205-217.
- FERNANDES TT, Santos ATF, Pimenta FC 2005. Atividade Antimicrobiana das Plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* E *Guazuma ulmifolia*. *Rev Patologia Trop* 34: 113-122.
- FERNÁNDEZ-TORRES B, Vásquez-Veiga H, Liovo X, Pereiro M, Guarro J 2000. In vitro susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. *Chemotherapy* 46: 390-394.
- FERNÁNDEZ-TORRES B, Cabañes FJ, Carrilo-Munõz AJ, Esteban A, Inza I, Abarca L, Guarro J 2002. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. *J Clin Microbiol* 40: 3999-4003.
- FERNÁNDEZ-TORRES B, Inza I, Guarro J 2003. Comparasion of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3371-3372.
- FERREIRA MB 1980. Frutos comestíveis nativos do cerrado em Minas Gerais. *Inf Agrop* 6: 9-18.
- FERREIRA ICP, Lonardoní MVC, Machado GM, Leon LL, Gobbi Filho L, Pinto LHB, Oliveira A 2004. Atividade anti-leishmania de extrato alcalóide de *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 325-327.

- FILHO VC & Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificações estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21: 99-105.
- FILIPPIN FB, Souza LC 2006. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Braz J Pharm Sc* 42: 167-194.
- FILIÚ WFO, Wanke B, Aguenta SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lázera M 2002. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc bras Med Trop* 35: 591-595.
- FORTES RC, Novaes MRCG 2006. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Rev Bras Cancerologia* 52: 363-371.
- FORTES ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macedo RCL, Wanke B 2001. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44: 137-140.
- FOSTER FW, Ghannoum MA, Elewski BE 2004. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol* 50: 748-752.
- FRANZOT SP, Salkin IF, Casadeval A 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 37: 838-840.
- GAZZANEO LRS, Lucena RFP, Albuquerque UP 2005. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *J Ethnobiol and Ethnomedicine* 1: 9.
- GEORGOPAPADAKOW NH 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1: 547-557.

- GIACOMINI RA, Ligiéro CPB, Andrão PSS, Miranda PCML, Braz-Filho R 2000. Estudo fitoquímico do extrato hexânico do epicarpo de *Hymanaea stignocarpa* (jatobá-do-cerrado). *Soc Bras Química, 29º reunião*.
- GOBBO-NETO L, Lopes NP 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30: 374-381.
- GONÇALVES AL, Alves Filho A, Menezes H 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Inst Biol* 72: 353-358.
- GRANATO D, Nunes DS, Mattos PP, Rios EM, Glinski A, Rodrigues LC, Zanusso Júnior G 2005. Chemical and biological evaluation of rejects from the Wood industry. *Brazilian Archives Biol Technol* 48: 237-241.
- GUÉHO E, Midgley G, Guillot J 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 337-355.
- GUILLOT J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B 1996. Identification of *Malassezia* species a practical approach. *J Mycol Med* 6: 103-110.
- GUPTA AK, Del Rosso JQ 2000. An evaluation of intermittent therapies used to treat onychomycosis and other dermatomycoses with the oral antifungal agents. *Int J Dermatol* 39: 401-411.
- GUPTA AK, Bluhm R, Summerbell 2002. Pityriasis versicolor. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16: 19-33.
- GUPTA AK, Adamiak A, Cooper EA 2003a. The efficacy and safety of terbinafine in children. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17: 627-640.
- GUPTA AK, Ryder JE, Nicol K, Cooper EA 2003 b. Superficial fungal infections: an update on pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, tinea capitis and onychomycosis. *Clin Dermatol* 21: 417-425.

- GUPTA AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL 2004. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatology* 51: 785-798.
- HAFEZ KA, Aty MAA, Hofny ERM 2003. Prevalence of skin diseases in rural areas of Assiut Governorate, Upper Egpy. *Int J Dermatol* 42: 887-892.
- HALE EK, Keltz A, Pomeranz M 2002. Dermatologic agents during pregnancy and lacaion: an update and clinical review. *Rev Intern Dermatol Denmacosm* 41: 197-203.
- HAMBURGER M, Hostettmann K 1991. Bioactivity In Plants: The Link Between Phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30: 3864-3874.
- HANN IM, Prentice HG 2001. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 161-169.
- HAWKSWORTH DL 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- HAY RJ 2006. Fungal infections. *Clin Dermatol* 24: 201-212.
- HELFAND WH, Cowen DL 1990. Pharmacy – an illustrated history, Harry N. Abrams, New York.
- HERBRECHT R 2004. Posoconazole: a potent extended-spectrum triazole anti—fungal for the treatment of serius fungal infections. *Int J Clin Pract* 58: 612-624.
- HERNADÉZ FH, Tovar LJM, Mora EB, López A A, Bermejo AV, Martinez RL 2003. Espécies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y a piel sana em población mexicana. *Rev Iberoam Micol* 20: 141-144.
- HIBBETT DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch T, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Poweel MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA,

- Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, et al. 2007. A higher level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111: 509-547.
- IKEDA R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T 2002. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* Species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 40: 1214-1218.
- INGORDO V, Naldi L, Colecchias B, Licci N 2003. Prevalence of pityriasis versicolor in young Italian sailors. *Br J Dermatol* 149: 1270-1272.
- INSTRUÇÃO NORMATIVA N 003/2008, de 20 de fevereiro de 2008. Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Pará. Diário Oficial Nº 31112 de 21/02/2008.
- JOHNSON LB, Kauffman CA 2003. Voriconazole. A new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis*.36: 630-637
- KANO R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A 1999. Phylogenetic realtion of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporum* and *Trichophyton* in chitin synthase 1 (*CHS*) genes sequences. *Mycopathologia* 146: 111-113.
- KARAMAN I, Sahin F, Gulluce M, Ogutçu H, Sengul M, Adiguzel A 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 85: 231-235.
- KAUFFMAN CA 2006. Clinical efficacy of new antifungal agents. *Curr Op Microb* 9: 483-488.
- KAWAKAMI K 2002. Role of natural killer T cells in host defence against cryptoccal infection. *Rev Iberoam Micol* 19: 149-154.
- KHAN ZU, Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Chandy R 2007. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from

decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in North-western India. *J Antimicrobial chemotherapy* 1-5.

KHAWCHAROENPORN T, Apisarnthanarak A, Mundy LM 2007. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 35: 51-57.

KIDD SEF, Hagen RL, Tscharke M, Huynh KH, Bartlett M, Fyfe L, Macdougall T, Boekhout KJ, Kwon-Chung W 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (BC, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17258-17263.

KINGSTON DGI, Rao MM, Zucker WV 1979. Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *J Nat Prod* 42: 496-499.

KLINK CA, Machado RB 2005. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1: 147-155.

KOBAYASHI CCBA, Souza LKH, Fernandes OFL, Brito SCA, Silva AC, Sousa WD, Silva MRR 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 47: 303-207.

KOMAID AVG, Kestelman IB 2002. Unusual presentation of *Microsporum canis* in human hair. *Med Mycol* 40: 419-423.

KORFFEL A, Menssen HD, Schwartz S, Thiel E 1998. Cryptococcosis in Hodgkin's disease: description of two cases and review of the literature. *Ann Hematol* 76: 283-286.

KOSE O, Erbril H, Gur AR 2005. Oral itraconazol for the treatment of seborrhoeic dermatitis: an open, noncomparative trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19: 172-175.

- KROCKENBERGER MB, Canfield PJ, Malik R 2002. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. neoformans* var. *gattii* and investigation of environmental sources. *Med Mycol* 40: 263-272.
- KUSHWAHA RKS, Guarro J 2002. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44: 150.
- KWON-CHUNG KJ, Boekhout T, Fell JW, Dias M 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremeliomycetidae). *Taxon* 51: 804-806.
- KWON-CHUNG KJ, Varma A 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research* 6: 574-587.
- LACAZ CS, Del-Negro G 1994. Drogas antifúngicas; terapêutica das micoses In: Silva P Farmacologia. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p.1156-1190.
- LARONE DH 1996. Culture and identification of dermatophytes. *Clin Microbiol Newsl* 18: 33-40.
- LAURENSEN IF, Trevett AJ, Lallo DG, Nwokolo N, Naraqui S, Black J, Tefurani N, Saweri A, Mavo B, Igo J, Warrell DA 1996. Meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and var. *neoformans* in Papua New Guinea. *Trans Royal Soc of Trop Medicine Hygiene* 90: 57-60.
- LAZÉRA MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 38: 379-383.
- LEBWOHL MG, Daniel CR, Leyden J, Mormon M, Shavin JS, Tschén E, Weiss J, ZONE J 2001. Efficacy and safety of terbinafine for nondermatophyte and mixed

- nondermatophyte and dermatophyte toenail onychomycosis. *Int J Dermatol* 40: 358-360.
- LEE Yin-Tse, Langenheim, JH 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detariae). University of California Publications in Botany 69: 1-109.
- LEMOS JA, Passos XS, Fernandes OFL, Paula JR, Ferri PH, Souza LKH, Lemos AA, Silva MRR 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 55-58.
- LIMA EO, Gompertz AF, Paulo MQ, Giesbrecht AM 1992. *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. *Rev Microbiol* 23: 235-238.
- LIN X, Heitman J 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* Species complex. *Annu Rev Microbiol* 60: 69–105
- LIU D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J 2001. A specific PCR assay for dermatophytes fungus *Microsporum canis*. *Med Mycol* 39: 215-219.
- LJUBOJEVIC S, Skerlev M, Lipozencic J, Juzbasic AB 2002. The role of *Malassezia furfur* in dermatology. *Clin Dermatol* 20: 179–182.
- LORENZI H 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum (1).
- LUNA J, Santos AF, Lima MR, Omena MC, Mendonça FA, Bieber LW, Sant'ana AE 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 97: 199-206.
- MACÊDO DPC, Neves RP, Magalhães OMC, Souza-Motta CM, Queiroz LA 2005. Pathogenic aspects of *Epidermophyton floccosum* Langeron et Milochevitch as a possible aethiological agent of tinea capitis. *Braz J Microbiol* 36: 36-37.

- MACIEL MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 429-438.
- MACKINDER B 2005. Detarieae. In: Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M. Legumes of the world. *Royal Botanic Gardens Kew* 69-110 p.
- MAERTENS JA 2004. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 10: 1-10.
- MAHMOUDABADI AZ 2005. A study of dermatophytosis in South West of Iran (Ahwaz). *Mycopathologia* 160: 21-24.
- MAKIMURA K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H 2000. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol* 49: 29-35.
- MARCON MJ, Powell DA 1992. Human Infections Due to *Malassezia* spp. *Clin Microbiol Rev* 5: 101-119.
- MARSAIOLI AJ, Leitão Filho HF, Campello JP 1975. Diterpenes in the bark of *Hymenaea coubaril*. *Phytochemistry* 14: 1882-1883.
- MARTIN MV 1999. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrob Chemother* 44: 429-437.
- MELLADO E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL 2003. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20: 523-539.
- MEYER LRD 1994. Treatment of fungal infections in patients with HIV- infection or AIDS. *ZbBak* 281: 1-7.

- MEZARI A 1998. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 40: 71-76.
- MIDGLEY G 2000. The Lipophilic yeasts: state of the art and prospects. *Med Mycol* 38: 9-16.
- MIRANDA LGA, Magalhães V, Lima EO, Oliveira NM, Vieira WL 2005. Pitiríase versicolor: abordagem clínica e laboratorial. *Rev Patol Trop* 33: 265-275.
- MITCHELL TG, Perfect JR 1995. Cryptococcosis in the era of AIDs-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8: 515-548.
- MONTENEGRO H, Paula CR 2000. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol* 38: 385-390.
- MORAIS IC, Silva LDG, Ferreira HD, Paula JR, Tresvenzol LMF 2005. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia. *Rev Elet Farmacia* 2: 13-16.
- MORAIS SM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhães 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Braz J Pharmacogn* 15: 169-177.
- MORERA Lopez Y, Torre-Rodriguez JM, Jimenez Cabello T 2005. Estudio de la sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de mohos y leveduras a itraconazol y voriconazol. *Rev Iberoam Micol* 22: 105-109.
- MUELLER GM, Schmit EJP 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv* 16: 1-5.
- MUKHERJEE PK, Leidich SD, Ishan N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA 2003. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 82-86.
- MYERS N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

- NAKANO N, Himruma M, Shiraki Y, Chen X, Porgpermddee S, Ikeda S 2006. Combination of pulse therapy with terbinafine tablets and topical terbinafine cream for the treatment of dermatophyte onychomycosis: a pilot study. *J Dermatol* 33: 753-758.
- NEVES MCA, Neves PCA, Zanini Jr. JC, Medeiros YS, Yunes RA, Calixto JB 1993. Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Phytotherapy Research* 7: 356–362.
- NEWMAN DJ, CRGG GM, Snader KM 2003. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.
- NOGUEIRA RT, Shepherd GJ, Laverde Jr A, Marsaioli AJ, Iamamura PM 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry* 58: 1153-1157.
- ODDS FC 2003. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. *Mycologist* 17: 51-55.
- OFFIAH VN, Chikwendu UA 1999. Antidiarrhoeal effects of *O. gratissimum* leaf extract in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 68: 327-330.
- OLIVEIRA JAA, Barros JA, Cortez ACA, Oliveira JSRL 2006. Micoses superficiais na cidade de Manaus/AM, entre março e novembro/2003. *An Bras Dermatol* 81: 238-243.
- OLIVEIRA JR, Mazocco VT, Steiner D 2002. Pitiríase versicolor. *An bras Dermatol* 77: 611-618.
- OLIVEIRA MM, Gilbert B, Mors WB 1968. Triterpenes in *Caryocar brasiliensis*. *Acad Brasil Cienc* 40: 451-452.
- OLIVEIRA AJB 1999. Estudo de seis espécies do gênero *Aspidosperma* utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise qualitativa e quantitativa, testes bioautográfico, cultura de

- tecidos e células vegetais e rota de preparação dos compostos diméricos ramiflorina A e ramiflorina B, PhD Thesis, UNICAMP, Campinas.
- OSTROSKY-ZEICHNER L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH 2003. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. *Clin Infect Dis* 37: 415-425.
- PAPPALARDO MCSM, Melhem MSC 2003. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 299-305.
- PARK YM, Kim CW 1997. Acute generalized exanthematous pustulosis induced by itraconazole. *Am Acad Dermatol*. 36: 794-796.
- PASSONI LFC, Wanke B, Nishikawa MM, Lazéra MS 1998. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brasil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med Mycol* 36: 305-311.
- PASSONI LFC 1999. Wood animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Rev Iberoam Micol* 16: 77-81.
- PASSOS XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFL, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR 2002. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 623-627.
- PASSOS XS, Castro ACM, Pires JS, Garcia ACF, Campos FC, Fernandes OFL, Paula JR, Ferreira HD, Santos SC, Ferri PH, Silva MRR 2003. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. *Pharm Biology* 41: 321-326.
- PAULA TF, Garcia ACF, Oliveira CMA, Martinez RC, Silva MRR 2001. Propriedades antifúngicas de *Hyptis ovalifolia* sobre *Cryptococcus neoformans*. Resumo dos Anais do XIII Encontro Científico dos Acadêmicos de Medicina 21 p.

- PAUW BE 2000. New antifungal agents and preparations. *J. Antimicrob. Agents*, 16:147-150.
- PEDROSO RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC 2007. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 566-568.
- PENNA G, Ramos A, Café ME, Penna ML, Campos MR, Martelli CMT 2006. Nosologic prolife of dermatologic visits in Brazil. *An Bras Dermatol* 81: 545-554.
- PEREDA-MIRANDA R, Delgado G 1990. Chemical studies on Mexican Hyptis species. Part 2. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *J Natural Products* 53: 182-185.
- PETRIKKOS G, Skiada A. Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents* 30: 108-117.
- PETTIT GR, Meng Y, Stevenson CA, Doubek DL, Knight JC, Cichacz Z, Pettit RK, Chapuis JC, Rates SMK 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613
- PHILLIPSON JD 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56: 237-243.
- QUÍNDOZ G, Ruesga MT, Martín-Mazuelos E, Salesaa R, Alonso-Vargas R, Carrillo-Munõz AJ, Brena S, San Millán R, Pontón J 2004. In vitro activity of 5-fluorocytodine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and the other medically important yeasts. *Rev Iberoam Micol* 21: 63-69.
- QUINTERO MEA, Perfetti DJC 2004. Aspectos clínico-epidemiológicos de le pitiriasis versicolor (PV) em uma comunidade pesquera de la región semiárida del Estado Flacón, Venezuela. *Rev Iberoam Micol* 21: 191-194.
- RATTER JA, Ribeiro JF, Bridgewater 1997. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230.

- REHDER VLG, Machado ALM, Dermelina C, Sartoratto A, Duarte MCT, Figueira GM 2004. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de duas espécies de *Origanum*. *Rev Bras Plantas Medicinai* 6: 67-71.
- REIS CMS, Gaspar APA, Gaspar NL, Leite RMS 1992. Estudo da flora dermatofítica na população do Distrito Federal. *An Bras Dermatol* 67: 103-111.
- REZENDE C, Borsari GP, Silva ACF, Cavalcanti RR 2008. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Anal Clin* 40: 13-16.
- RIPPON JW 1985. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. In: McGinnis, MR, Ed. Current topics in medical Mycology. New York, Springer-Verlag 1: 208-234.
- RIZZINI CT 1985. Plantas do Brasil: Árvores e madeiras úteis do Brasil – Manual de dendrologia brasileira. 2 ed., São Paulo: Edgar Blucher 124-128 p.
- ROMANO C, Maritati E, Ghilardi A, Miracco C and Mancianti F 2005. A case of pityriasis versicolor atrophicans. *Mycoses* 48: 439-441.
- ROSA CS, Martins AA, Santim R, Faria RO, Nobre MO, Meireles CA, Mdrid IM, Nascente OS 2006. *Malazessia pachydermatis* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil. *Acta Scientias Veterinariae* 34: 143-147.
- RUBIO MV, Rezusta A, Tomás JG, Ruesca RB 1999. Perspectivs micológica de los dermatófitos em el ser humano. *Rev Iberoam Micol* 16: 16-22.
- RUIZ ALTG, Magalhães EG, Magalhães AF, Faria AD, Amaral MCE, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA 2005. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 98-102

- RUIZ LRB, Zaitz C 2001. Dermatófitos na cidade de São Paulo no período de agosto de 1996 a julho de 1998. *An bras Dermatol* 76: 391-401.
- SAAG MS, Graybill RJ, Larsen RA 2000. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin infect Dis* 30: 710-718.
- SABO JA, Abdel-Rahman SM 2000. Voriconazole a new triazole antifungal. *Ann Pharmacother* 34: 1032-1043.
- SALAH SB, Makni F, Marrakchi S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Bouassida S, Zahaf A, Ayadi A 2005. Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. *Mycoses* 48: 242-245.
- SARTORI MRK 2005. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Tese de Mestrado da Universidade do Vale do Itajáí.
- SCHAPOVAL EES, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT 1994. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora*. *J Ethnopharmacol* 44: 137-142.
- SCORZONI L, Benaduci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Gianinni MJSM 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Braz J Microbiology* 38: 391-397.
- SHANLEY P, Medina G 2005. Árvores frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém: CIFOR, Imazon, ISBN 85-88808-02-1.
- SHARON CAC, Sorrell TC 2007. Antifungal agents. *MJA* 187: 404-409.

- SHIN S, Lin S 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J App Microbiol* 97: 1289-1296.
- SILVA JA, Silva DB, Junqueira NTV, Andrade LRM 1994. Frutas nativas dos cerrados. Planaltina; EMBRAPA-CPAC 166p.
- SILVA MRR, Oliveira JG, Fernandes OFL, Passos XS, Costa CR, Souza LKH, Lemos JA, Paula JR 2005. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. *Mycoses* 48: 172-175.
- SILVA MR, Silva MS, Martins KA, Borges S 2001. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e do jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. *Cienc Tecnol Aliment* 21: 176-182.
- SILVA MV, Costa TR, Costa MR, Ferreira EC, Fernandes OFL, Santos SC, Lião LM, Ferri PH, Paula JR, Ferreira HD, Silva MRR 2001. Growth inhibition effect of brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species. *Pharmaceutical Biology* 39: 138-141.
- SILVA JMC, Bates JM 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical hotspot. *BioScience* 52: 225-233.
- SIMMONS RB, Guého E 1990. A new species of *Malassezia*. *Mycol Res* 94: 1144-1146.
- SIMPANYA MF 2000. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. *Rev Iberoam Micol* 17: 1-12.
- SIQUEIRA JO, Lambais MR, Stürmer SL 2002. Fungos micorrízicos arbusculares - características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. *Biotechnol Ciência Desenv* 25: 12-21.

- SIXEL PJ, Pecinalli NR 2002. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. *Infarma*, 15: 70-73.
- SMITH EB, Stein LF, Fiverson DP 2000. The safety of terbinafine in patients over the age of 60 years: a multicenter Trial in onychomycosis of the feet. *Int J Dermatol* 39: 859-864.
- SOUZA LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Santos SC, Oliveira Jr JG, Miranda ATB, Liao LM, Silva MRR 2002. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Braz J Microbiol* 33: 247-249.
- SOUZA LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Oliveira Junior JG, Souza Junior AH, Fernandes OFL, Silva MRR 2003. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 963-965.
- SOUZA, ACM 2006. Propriedades antifúngicas de *Aspidosperma ramiflorum* sobre dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*. Trabalho de especialização em Microbiologia apresentado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.
- SPRINGFIELD EP, Amabeoku G, Weitz F, Mabusela W, Johnson Q 2003. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine* 10: 434-439.
- STEENBERGEN JN, Casadevall A 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 5: 667-675.
- SWINNE D, Deppner M, Maniratunga S, Laroche R, Floch JJ, Kadende P 1991. AIDS-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: An epidemiological study. *J Med Veter Mycol* 29: 25-30.

- TARAZOOIE B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomoridian K, Saadat F, Zeraati H, Hallaji Z, Rezaie S 2004. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatology* 4: 1-6.
- TERREL CL 1999. Antifungal agents. Part II. The azoles, *Mayo Clin Proc* 100: 74-78.
- TRACZ JS, Didomenico B 2001. Antifungals: what's in the pipeline. *Antimicrobials* 4: 540-545.
- URBINI B, Castellini C, Rondelli R, Prete A, Pierinelli S, Pession A 2000. Cryptococcal meningitis during front-line chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 85: 1103-1104.
- VALENTIM APT 2006. Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stignocarpa* Matr. Ex. Hayne (jatobá). Tese de Mestrado da Universidade Federal Do Pernambuco.
- VALIENTE MFC, Alberdi M, Meseguer I, Torres-Rodriguez JM 1997. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de médio ambiente de Alicante. *Rev Iberoam Micol* 14: 63-64.
- VANDEN BOSSCHE H 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14: 44-49.
- VENKATESAN P, Perfect JR, Myers S 2005. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatol Ther* 18: 44-57.
- VERPOORTE R 1987. Medicinal plants of Surinam. IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 21: 315-18.
- VIEIRA RF, Martins MVM 1998. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. In: Proc Int Savana Symposium, Brasilia, DF, Embrapa/ CPAC 169-171p.

- VIEIRA RF 1999. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. Reprinted from: Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.
- VIGOUROX S, Morin O, Milpied NB, Rapp MJ, Harousseau JL 2000. Infection a *Cryptococcus neoformans* dans les hémapathies malignes. *Rev Med Int* 21: 955-960.
- VILA VERDE GM, Paula JR, Carneiro DM 2003. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Rev Bras Farmacognosia* 13: 64-66.
- WEITZMAN I, Summerbell RC 1995. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 8: 240-259.
- WOLDEAMANUEL Y, Mengistu Y, Chryssanthou E, Petrini B 2005. Dermatophytosis in Tulugudu Island, Ethiopia. *Med Mycol* 43: 79-82.
- YAMAGISHI T, Zhang C, Chang JJ, Mcphail DR, Mcphail A T, Lee KH 1988. Antitumor agents. Part 94. The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid A and B. *Phytochemistry* 27: 3213-3216.
- YUNES RA, Calixto JB 2001. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 500p.

Anexo

Artigo “**Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans***” enviado a Revista “*Mycoses - Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*”.

Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*

Antifungal activity of *Hymenaea martiana*

Ana Cristina Machado de Souza¹, Lucilia Kato², Cleuza Silva², Amanda Cidade²,
Cecilia Maria Alves Oliveira², Maria do Rosário Rodrigues Silva^{1*}

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG, Rua 235 S/N, 74605-050
Goiânia, GO, Brasil.

² Instituto de Química/UFG, Campus Samambaia CP 131, 74001-970 Goiânia, GO,
Brasil

Abstract

The biological activity of crude extract and fractions of *Hymenaea martiana* was evaluated against a panel of human pathogenic fungi. The extracts showed a high activity against *Trichopyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Cryptococcus neoformans* species complex isolates, but it was not active towards *Malazessia furfur*, *M. obtusa* and *M. sympodialis*. The activity of the extracts can be attributed to triterpenoids.

Keywords: *Hymenaea martiana*, antifungal activity, plants of Cerrado, Susceptibility test, plant extract

Introduction

Brazilian savannas known as “Cerrado” have a diverse flora with several species used in traditional medicine, many of them possessing antibacterial and antifungal

properties. Plants from the genus *Hymenaea* (Fabaceae family) are commonly used in traditional Brazilian medicine to treat inflammatory process bacterial infections, rheumatism and anemia.^{1,2,3} The trunk exudes a resin, which is used locally in folk medicine for treatment of bronchitis and stomach disorder.^{4,5} *Hymenaea martiana* Hayne sort, known as jatobá or jatobá-da-mata is native South America, México and Cuba. In Brazil it can be found in Cerrados (the states of Minas Gerais, Bahia, Goiás and Tocantins) and in the state of Amazônia.⁶ Previous studies have showed antinociceptive, antioedematogenic, analgesic and anti-inflammatory activities related with hydro -alcoholic extracts of the *H. martiana*.⁷

*Corresponding author: Maria do Rosario Rodrigues Silva

IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Rua 235 - s/n - Setor Universitário CEP: 74605050 - Goiânia - Goiás - Brasil

Telefones: (62) 3209 6109 - FAX: (62) 3521 1839

E-mail address: rosario@iptsp.ufg.br

The high prevalence of fungal infections in humans has increased interest in the development of new antifungal agents. Drugs used for treatment of cryptococcosis and dermatophytosis, such as griseofulvin, amphotericin B and azole derivatives can be toxic and present limited ability to clear the infection completely.^{8,9,10} In addition, resistance of fungi to these antifungal agents have been observed.^{11,12} The development of more effective and less toxic antifungal agents is required for the treatment of these mycoses.

In continuation of our systematic studies of the Brazilian Cerrado medicinal plants, we have undertaken a study of *H. martiana* with the purpose of evaluating the antifungal activity against dermatophytes, *C. neoformans* and *Malazessia spp.* Methods such as bioautography, disk diffusion, agar dilution and broth dilution can be employed for determination of antifungal activity for natural compounds.^{13,14,15,16} According to Scorzoni et al¹⁷ (2007) the microdilution method is more sensitive than other methods and allows for the detection of minimal inhibitory concentration (MIC) of plants extracts on fungi.

In order to detect new sources of antimicrobial agents in this work, *in vitro* antifungal activity of crude extract and fractions of *H. martiana* was tested against dermatophytes, *C. neoformans* and *Malazessia spp.*

Materials and methods

Plant Material

Aerial parts of *H. martiana* were collected in Goiânia city, Goiás, Brazil and authenticated by Professor Heleno Dias Ferreira, Departamento de Botânica, Universidad Federal de Goiás. Voucher specimens are deposited at the herbarium of the Universidade Federal de Goiás under the number 14203.

Preparation of the extracts and fractions

The air-dried and powdered pieces of the trunk and bark of the plant were extracted with hydroalcoholic solution (90% v/v) by maceration method at room temperature for 2 days. The suspension was filtered through a Buchner funnel with Whatman number 1 filter paper and the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure using rotary evaporator to give 8.36g of the crude extract. The crude extract was obtained with hexane and diethyl ether which after solvent evaporation gave 0.30g (A) and 0.90g (B), respectively. The residue remain (6g) was again diluted with methanol suspended in water (C) and then extracted with butanol which by evaporation, gave a solid residue (1.8g) (D). The hydroalcoholic fraction was freeze-dried to give 3.60g (E).

Microorganisms

The microorganisms used for the biological evaluation were clinical isolates obtained in Laboratório de Micologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal Goiás. The isolates were: 10 strains of *T. rubrum*, 10 of *T. mentagrophytes*, 10 of *M. canis*, 26 strains of *Cryptococcus neoformans*, 04 strains of *C. gatti*, 06 strains of *M. furfur*, 02 of *M. obtusa* and 02 of *M. sympodialis*. All isolates were maintained onto Sabouraud dextrose agar (SDA) at 4°C and subcultivated on fresh SDA at 25°C for 7 days for dermatophytes and 48 hours for *C. neoformans* for subsequent assays.

Each isolate was subcultured at least twice on Sabouraud dextrose agar to ensure purity and optimal growth before testing. For growth of *Malazessia* spp was used the Dixon medium. Strain of *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used as control.

Antifungal susceptibility testing

The antifungal activities of crude extracts and fractions of *H. martiana* were evaluated by using the broth microdilution methods described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for yeasts (M27-A2 document)¹⁸ or for filamentous fungi (M 38A).¹⁹ The broth microdilution method developed by CLSI M27A2 document is applicable for determination of the MIC against *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*, but it is not applicable to yeasts of genus *Malassezia* due to their obligatory lipophilic nature. The alternative approach has been assessed with broth

microdilution method using media as Leeming-Notman (LN) and modified Dixon.²⁰ The suspensions of *Cryptococcus neoformans* from 48h or of *Malassezia sp* from 5-days-old cultures were prepared in sterile saline (0.85%) adjusted with a spectrophotometer at a wavelength of 530 nm to a cell density of 0.5 McFarland standard.

This suspension was diluted at 1:50 followed by a 1:20 dilution in RPMI 1640 (for *Cryptococcus neoformans*) and in modified Leeming-Notman medium (for *Malassezia sp*) in order to obtain a final concentration of 1×10^3 to 5×10^3 CFU/mL. For dermatophytes, the fungal colonies were covered with approximately 10 mL of distilled water, and the suspensions were made by scraping the surface with the tip of a sterile loop. The resulting mixture of conidia and hyphal fragments was withdrawn and transferred to sterile tubes and left for 15 to 20 minutes at room temperature to sediment the heavy particles. The optical density of the suspensions containing conidia and hyphal fragments was read at 530 nm, adjusted to transmittance of 65 to 70% (2 to 4×10^6 cells/mL) and diluted at 1:50 followed by a 1:20 with RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to obtain the final inoculum size of approximately 0.4 to 5×10^4 cells/mL.

The extracts and fractions obtained of *H. martiana* were dissolved in dimethyl sulfoxide and diluted in RPMI medium buffered to a pH 7.0 with MOPS for *C. neoformans* and dermatophytes and media as Leeming-Notman for *Malassezia spp*, being that the extract final concentrations ranged from 1.0 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. Aliquots of 100 μL of suspensions of fungi as well as 100 μL of plant extract of specific concentration were inoculated in the wells of a microtiter plate. For each test plate, two controls were included, one containing the medium alone (sterile control) and the other containing 100 μL of medium plus 100 μL of inoculum suspension (growth control). For determination of MIC, the plates were incubated at 35°C and the reading was performed after 48h and 72h for *C. neoformans* and after 5 days for *Malassezia spp* while for dermatophytes these plates were incubated at 28°C and the reading was performed every 24 h until the control well showed indication of growth. Each assay was carried out in duplicate.

Reading and interpretation of MIC

For all extracts, the MIC was defined as the lowest concentration showing 100% growth inhibition. Extracts with MICs $< 250 \mu\text{g/mL}$ were considered active according

to Scorzoni et al¹⁶ (2007). The MIC ranges, MIC₅₀, MIC₉₀ and geometric mean were obtained to facility comparison of the activities of tested extract.

Results and Discussion

None of the extracts was active towards the yeasts *Malassezia* spp. In contrast, different results were obtained against *C. neoformans* and dermatophytes isolates. The crude extract of *H. martiana* showed a broad spectrum of action against these fungi. Since crude extract showed both strong and broad spectrum antifungal activity, it was partitioned with hexane (fraction A) and diethyl ether (fraction B) and the insoluble residue was dissolved in methanol (fraction C). Although isolates of *C. neoformans* and dermatophytes were susceptible to the crude extract and the fraction C of *H. martiana*, fractions A and B showed no activity against the same pathogenic fungi with MIC > 1024 µg/mL. Then the fraction C was fractionated into fraction D and fraction E to find out the active fraction responsible for these activities.

Table 1 shows the *in vitro* susceptibilities of the crude extract and fractions C, D and E of *H. martiana* against *C. neoformans* and *C. gattii*. High activity was observed with MICs between 2 to 64 µg/mL. The lowest MIC values were found for crude extract and for fraction E of *H. martiana* against *C. neoformans* and *C. gattii*. *C. neoformans* is a ubiquitous and opportunistic yeast causing meningoencephalitis in immunocompromised patients.^{21,22,23} In a study of AIDS patients from 1980 to 2002, it was found that out of 215,810 patients, 60% presented cryptococcosis at the time of diagnosis.²⁴

The results of the antifungal assay showed antifungal activity of *H. martiana* against all dermatophytes studied. The lowest MIC values were found for fraction C and fraction D against the three species tested. Variation of susceptibility was found among the three species of dermatophytes. *T. rubrum* (geometric mean =21.11 µg/ml for D fraction) was most susceptible. *T. rubrum* is the most common ethiological agent of all clinical infections produced by dermatophytes²⁵ and is responsible for 80-90% of all chronic and recurrent infections.²⁶ The results of MIC values for each dermatophytes, the MIC₅₀, MIC₉₀ values and Geometric mean are presented in Table 2.

Fungal infection therapy can have considerable side-effects and adverse effects accompanied by the development of resistance by fungi.⁹ Therefore, plant-derived compounds are of interest in this context because they comprise safe or more effective substitute for synthetically produced antimicrobial agents.

The present investigation represents a preliminary screening for antifungal activity and points to the necessity of deeper phytochemical and biological investigation, since this species has great potential to yield biologically active products. In further study, the active compounds will be isolated from polar fractions of *H. martiana* and their IC50 values will be determined. Recent results with ¹H and ¹³C NMR spectra of polar fraction C (data not shown) demonstrate the presence of several signals that can be attributed the presence of triterpenoids in the fraction C.

References

1. Agra MF, Freitas PF, Barbosa Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 2007; **17**: 114-40.
2. Gazzaneo LRS, Lucena RFP, Albuquerque UP. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *J Ethnobiol Ethnomed* 2005; **1**: 9.
3. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst. Biol* 2005; **72**: 353-8.
4. Correa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Ministério da Agricultura*. Rio de Janeiro: IBDF.1984.
5. Marsaioli AJ, Leitão Filho HF, Campello JP. Diterpenes in the bark of *Hymenaea coubaril*. *Phytochemistry* 1975; **14**: 1882-3.
6. Lorenzi H. Árvores Brasileiras, Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, Brasil, 1992; 21-6.
7. Neves MCA, Neves PCA, Zanini Jr. JC, Medeiros YS, Yunes RA, Calixto JB. Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Phytother Res* 1993, **7**: 356–62.
8. Archibald LK, Tuohy MJ, Wilson DA. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 143-5.

9. Fernández-Torres, Inza BI, Guarro J. Comparasion of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3371-2.
10. Gupta AK, Ryder JE, Johnson AM . Cumulative meta-analysis of systemic antifungal agents for the treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol*. 2004; **150**: 537-44.
11. Graybill JR. The future of antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 1996; **2**: S166-78.
12. Maertens JA, Boogaerts MA. Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. *Curr Pharm Des*. 2000; **6**: 225-39.
13. Cos P, Vlietinck AJ, Beghe DV, Maesa L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 2006; **106**: 290-302.
14. Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, Sokem A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 2006; **13**: 515-21.
15. Passos XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFL, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; **35**: 623-27.
16. Stein AC, Alvarez S, Avancini C, Zacchino S, Von Poser G .Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 2006; **107**: 95-8.
17. Scorzoni L, Benaduci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Gianinni MJSM. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Braz J Microbiol* 2007; **38**: 391-97.
18. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A2, Pennsylvania, 2002; **17**:1- 39.
19. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard. Document M38-A, Pennsylvania. 2002; **22**:1- 40.
20. Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new

- triazole posaconazole and six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and estest. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 3589-93.
21. Alspaugh JA, Perfect JR. Cryptococcal meningitis. *Curr Treat Opin Infect Dis* 2002; **4**: 75-80.
 22. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press 1998; p.41.
 23. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 515-48.
 24. Ministério da Saúde do Brasil. Dados e pesquisa em DST e AIDS Coordenação do Programa Nacional de DST/AIDS. Brasília, DF (2002).
 25. Costa M, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos JA, Oliveira Júnior JG, Silva MRR. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; **35**: 19-22.
 26. Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Urrea-Arbeláez A, López-Jodra O. Terbinafina por via orl em El tratamiento de La tinea unguium de los pies. Eficacia entre 12 y 14 semanas de tratamiento. *Rev Iberoam Micol* 1998; **15**: 160-162.

Table 1: *In vitro* susceptibility of 30 isolates *Cryptococcus* to extracts of *H. martiana*

Extracts and fractions of <i>H. martiana</i>	MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>C. neoformans</i> (26)				<i>C. gattii</i> (04)			
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	GM	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	GM
crude extract	2-64	4	16	5.81	4-16	8	16	9.51
Fraction C	4-64	16	32	19.28	8-32	16	32	19.02
Fraction D	4-32	8	8	7.38	8-16	16	16	13.45
Fraction E	2-16	8	8	6.29	2-8	8	8	5.66

MIC 50= inhibition of 50% of isolates, MIC 90= inhibition of 90% of isolates, GM= Geometric mean.

Table 2: *In vitro* activity of *H. martiana* towards 30 dermatophytes isolates.

Species (n° of isolates)	Extracts of <i>H. martiana</i>	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	GM
<i>T. rubrum</i> (10)	Crude extract	32-128	64	64	55.72
	Fraction C	16-64	16	32	24.25
	Fraction D	8-32	16	32	21.11
	Fraction E	64-128	128	128	97.00
<i>T. mentagrophytes</i> (10)	Crude extract	128-1024	128	512	222.86
	Fraction C	16-64	32	64	29.86
	Fraction D	16-128	64	64	51.98
	Fraction E	256-1024	512	512	445.72
<i>M. canis</i> (10)	Crude extract	128-512	256	512	256.00
	Fraction C	32-128	64	128	64.00
	Fraction D	64-256	128	128	97.00
	Fraction E	256-1024	512	1024	588.13

MIC 50= inhibition of 50% of isolates, MIC 90= inhibition of 90% of isolates, GM= Geometric mean.

Conclusões

1. Esta planta mostrou-se ativa como antifúngica. Todos os extratos e frações de *H. martiana* mostraram-se capazes de inibir o crescimento de diferentes isolados de *C. neoformans* e de dermatófitos em concentrações $< 1024\mu\text{g/mL}$.
2. As frações metanólica e butanólica foram as mais ativas para dermatófitos, sendo que cerca de 90% desses fungos foram inibidos a uma concentração $\leq 128 \mu\text{g/ml}$. Para as espécies de *C. neoformans* testadas, todas as frações testadas consideradas foram bem ativas; com CIM $< 64 \mu\text{g/ml}$.
3. *T. rubrum* foi a espécie de dermatófito que apresentou menores valores de CIM, sendo que a fração metanólica de *H. martiana* apresentou valores de CIM $< 64 \mu\text{g/ml}$.
4. Os resultados dos extratos e frações de *H. martiana* sobre os isolados de *Malassezia* spp mostraram ausência de atividade sobre este fungo. *H. martiana* não inibiu o crescimento *in vitro* das espécies de *Malazessia* spp testadas.

5. A composição da fração metanólica(C) rica em triterpenóides, evidencia que provavelmente este componente é o principal responsável pela atividade antifúngica.
6. O presente estudo constitui uma investigação preliminar da atividade antifúngica de *H. martiana*, no entanto, estudos posteriores envolvendo principalmente o seu efeito tóxico devem ser realizados.

Normas para publicação

Mycoses

Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases

Official publication of Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft e.V. (DMyKG)

Edited by:

H. C. Korting

Print ISSN: 0933-7407

Online ISSN: 1439-0507

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 51 / 2008

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 24/41 (Dermatology); 10/19 (Mycology)

Impact Factor: 1.327

[Top](#) **Author Guidelines**

Downloads: [Exclusive Licence Form](#); [Colour Work Agreement Form](#)

GENERAL

Mycoses is dedicated to the publication of manuscripts on topics concerning medical or veterinary mycology. Studies on plant pathology or mycological papers on fungi not related to human or veterinary medicine do not lie within the scope of *mycoses* and will not be accepted.

Manuscripts may be published as original communication of normal or short length (*Short communication*). Reports on single cases (*Case reports*) are considered as *Letters to the editor*. The submission of review articles both of the mini-review and the full-length type is particularly encouraged. Only papers submitted in English will be accepted (this does not exclude the Latin text required for the description of new species or genera).

The editors reserve the right not to accept papers unless adherence to the principles given in the *Declaration of Helsinki* and the *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* (DHEW Publication NIH) is clear.

No charge is made for publication but authors will be required to pay for extensive alterations to agreed papers at proof stage.

Early View

Mycoses is covered by Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts are submitted to *mycoses* online, i.e. electronically, from the corresponding author's *Mycoses* Manuscript Central account. You will need your files in an electronic format, an Internet connection, and a user ID and password for the site. To begin a new submission, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/myc> and log in or create an account to get your user ID and password. Full instructions are provided on the site. If assistance is needed, the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

Mycoses c/o Editorial Office

Erika Ratzinger
Vohburgerstraße 13
80687 München, Germany
Phone: +49 (0)89 546 624 35
Fax: +49 (0)89 583 824
E-mail: mycoses.muenchen@t-online.de

Electronic submission

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files plus separate figure files. JPEG, TIFF or EPS files are acceptable for submission, but only high-resolution JPEG, TIFF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file.

Manuscripts should be formatted as described in *mycoses'* Author Guidelines (below). When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

For more information on preparing manuscripts for online submission, please read the detailed instructions at <http://mc.manuscriptcentral.com/myc>. Additional help is available by emailing support@scholarone.com/.

Authors may provide names of potential reviewers for their manuscript. All acceptable material submitted for publication is forwarded to the Deputy Editor in charge of the particular field who together with at least two further referees makes a judgement on the paper. The votes of the independent referees as well a preliminary suggestion of acceptance or rejection is forwarded by the Deputy Editor to the Editor-in-Chief who makes the final decision. Authors must inform the Editor of any possible conflict of interest capable of influencing their judgement, and if necessary, a disclaimer will be included.

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Authors resubmitting manuscripts should follow the same procedures as for submission of new manuscripts. If accepted, papers become the copyright of the journal.

After acceptance please make sure that the final manuscript and figure files are uploaded. **The figures must be high-resolution scans** (JPEG, TIFF or EPS files). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

COPYRIGHT ASSIGNMENT

Authors are no longer required to assign copyright in their paper. Instead authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Blackwell Publishing and *mycoses*. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement). Please download the [Exclusive Licence Form](#) here.

TEXT

Authors should aim for a concise readable style. Spelling should follow the *Concise Oxford Dictionary*, and *The Oxford Dictionary for Writers and Editors*. The Editor reserves the right to make corrections, both literary and technical, to the papers.

All pages must be numbered consecutively in the upper right-hand corner of each page. Starting with the title page as p.1, the pages should be numbered in the following order: title page, summary and key words, text, acknowledgements, references, tables, figure legends.

The following items should each start on a separate page.

Title Page

This should bear (1) the title, (2) the names of all authors, (3) the institutions of origin with brief addresses, (4) a short title of not more than 50 characters (including spaces) to be used as a running head, (5) a list of up to eight key words for indexing purposes, and (6) the name and full postal address (with phone and fax numbers and **e-mail address**) of the author who will be responsible for reading the proofs (the corresponding author). The corresponding author must keep the *mycoses* office informed of any change in details until the paper is published. Authors should keep a copy of their manuscript.

Summary

Normally in less than 210 words, this should indicate clearly the scope and main conclusions of the paper. Original articles should have a structured abstract, comprising the five headings: Background, Objectives, Patients/Methods, Results and Conclusions.

Main Text

Papers should be divided into sections headed (1) introduction, (2) materials and methods (or patients and methods/subjects and methods if human patients/subjects were used), (3) results, (4) discussion and (5) acknowledgements. Avoid an excess of sub-headings - two further divisions, if necessary, should be adequate.

The introduction should explain why the work was done and briefly introduce the scope and contents of the paper. Essential details should be included in materials and methods, including experimental design and statistical analysis. Results should be recorded in the past tense. The discussion should present the author's results in the broader context of other work on the subject. Acknowledgements should be as brief as possible.

REFERENCES

Please verify your references before submission and send them as a plain, unstructured list. We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Avoid using 'endnote' programs for the electronic copy. All references must be cited in numerical order in the text following the Vancouver system. The numbers of references should appear in the text in brackets e.g. [1, 21] or [1-4]. If giving the names of authors in the text the following form should be used: Brown & Smith [1] or Brown *et al.* [2] if there are more than two authors. Unpublished observations and personal communications may be included in the text only.

The reference list should show the references in numerical order as they appear in the text. References should include the following: (1) authors (surname followed by initials), (2) year, (3) title of (a) article or (b) chapter, (4) editors (if a book), (5) title of (a) journal or (b) book, (6) volume number, (7) place of publication and name of publisher (if a book), and (8) first and last page numbers of (a) article or (b) chapter. Journal titles should be abbreviated according to the system adopted in *Index Medicus*. The following format should be used:

Journal articles

(List all authors if six or fewer, list the first three then add *et al.* if there are seven or more).

1 Bloch B, Kretzel A. Econazole nitrate in the treatment of *Candida vaginitis*. *S Afr Med J* 1984; **58**: 314-472.

Books

2 Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman, W. A. Jr & Sodeman, W. A. (eds) *Pathogenic Physiology: Mechanisms of Disease*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1974: 457-72.

Work that has been submitted but not accepted for publication should not appear in the reference list but may appear in the text as unpublished observations. Work that has been accepted but not published should be included in the reference list stating the journal in which it is to appear followed by '(in press)'. Further details should be supplied as soon as possible.

LETTERS TO THE EDITOR

There are no keywords required. The references **must be integrated into the text** (Author AA et al., Journal 2002; 1: 242) or (Book author AA. Book Title, 2nd Edition, Publisher, Place, 1996).

TABLES

These must be numbered consecutively with arabic numerals and typed on separate sheets carrying an appropriate legend and presented in a way that makes the table self-explanatory.

Numerical results should be expressed as means with the relevant standard errors and/or statistically significant differences, quoting probability levels (P-values). Three significant figures are usually sufficient for mean values and standard errors should be quoted two or three more decimals than the mean.

The only lines appearing in the table should be horizontal and all decimals should be aligned in columns. The placement of all tables should be indicated in the text, being referred to as Table 1 or Tables 2 and 3.

FIGURES

Figures should be numbered in sequence in Arabic numerals as they appear in the text. Labels, lettering and symbols etc. must be professionally prepared and should be uniform. Lines should be of sufficient thickness to stand reduction (no less than 4 mm wide for a 50% reduction), and letters should be a minimum of 14 pt Times New Roman or an equivalent size. Acceptable symbols for experimental points are j , r , o , \sim , p , ϕ . The symbols $+$ and \times will not be accepted.

Legends should be typed on a separate sheet and consist of a short title together with a brief explanatory paragraph. The legend must make the meaning of each figure

understandable without further reference to the text. Photomicrographs should state the original magnification.

The position of all figures should be indicated in the text and should be referred to as Fig. 1 or Figs 1 and 3. Figure 1 should be written out in full if at the beginning of a sentence.

Colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). It is the policy of *Mycoses* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a [colour work agreement form](#) before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the internet. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form please contact the Editorial Office and they will be able to e-mail or fax the form to you. Once completed please return the form to the Editorial Office. **Any article received by Blackwell Publishing with colour artwork will not be published until the form has been returned.**

Electronic Artwork

Vector graphics (e.g. line artwork) should be saved in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. photographs) in Tagged Image File Format (TIFF). Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Full details of submission of figures in electronic format are available at: <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

If submitted as hardcopy, figures should be submitted as glossy prints in duplicate and preferably with a transparent overlay for protection. The overlay should be used to indicate masking instructions, lettering or arrows. Each figure should bear the number, author's name and an arrow to indicate the top in soft pencil on the reverse. If figures have more than one part, each part should be labelled (preferably) in the top left-hand corner with lower-case letters in parentheses e.g. a figure with two parts would be labelled (a) and (b). In the text this should be referred to as Fig. 1a or Figs 2a, b. Figures should be planned to fit the printed column, i.e. 7.9 cm wide for single column and 16.5

cm wide for double column. Photographs can be up to twice the reproduction size and must be unmounted glossy prints showing good detail and moderate contrast.

UNITS, SYMBOLS and ABBREVIATIONS

SI (Système International) units should be used and should conform with the lists printed *Units, Symbols and Abbreviations - A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* 4th edn as published by the Royal Society of Medicine. Nomenclature of disease should follow the *International Classification of Disease*, published by the World Health Organization, as far as possible.

When first mentioned, cumbersome medical names should be abbreviated for later reference in the text. Latin bi-nominals should abbreviate the genera to the initial letter after the first mention unless it begins a sentence.

Doses of drugs should be given as unit weight per body weight, e.g. mmol kg⁻¹. Rates should be expressed with negative indices. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. mmol l⁻¹, not mM.

Numerals are to be used from 10 upwards; and the 24-hour clock, e.g. 21.00 hours, should be used.

MATERIALS

The source of all materials used should be given stating company, city of location and country.

Verification of the identity of living specimens used must take place through sequencing, or by consultation of taxonomists working at a reference centre. Specimens analyzed must remain accessible for later reference. Strains should be deposited in one of the major culture collections, and sequences in a public data bank. Collection and sequence numbers must be cited in the text. It is recommended that new taxa are deposited in MycoBank. Descriptions of new taxa must comply with the rules of the International Code of Botanical Nomenclature.

PROOFS

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

OFFPRINTS

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

AUTHOR MATERIAL ARCHIVES POLICY

Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

AUTHOR SERVICES

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services: Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Last update: July 2008

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)