

IBERÊ FERREIRA DA SILVA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ESTUDO DO
MODO DE AÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DA ENTRECASCA
DO CAULE *Lafoensia pacari* St. Hil. (LYTHRACEAE)**

CUIABÁ – MT

2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE FARMACOLOGIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ESTUDO DO
MODO DE AÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DA ENTRECASCA
DO CAULE *Lafoensia pacari* St. Hil. (LYTHRACEAE)

Orientando: Iberê Ferreira da Silva Junior

Orientador: Profº. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins

Dissertação de Mestrado submetida como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Concentração Farmacologia, Sub-Área Farmacologia de Produtos Naturais.

CUIABÁ – MT

2005

F738r Silva Junior, Iberê Ferreira.

Avaliação da atividade antifúngica e estudo do modo de ação de extratos e frações da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) / Iberê Ferreira da Silva Junior. – Cuiabá: o Autor, 2005.

33 p.

Orientação: Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso. Faculdade de Ciências Médicas. Campus Cuiabá.

1. Patologia. 2. Hepatite. 3. *Lafoensia pacari*. 4. Mangava-brava. 5. Atividade antifúngica. 6. Extratos e frações. 7. *Neurospora crassa*. I. Título.

CDU 616.36-002+616-022.3

DEDICATÓRIA

À minha família,
pelo amor, incentivo e confiança
em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins**, pela oportunidade e orientação em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais, **Iberê e Rainúzia**, pelo incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Federal de Mato Grosso** pela minha formação profissional.

À **Coordenação** do Curso de Pós-graduação pelo apoio financeiro e ajuda de custos em viagens.

Ao **CYTED e Universidade Nacional de Rosário/Argentina**, em especial a **Profª. Drª. Susana Zacchino**, pelo pagamento de passagens e diárias, além da colaboração na execução deste trabalho.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Instituto Adolfo Lutz**, em especial as grandes amigas, **Márcia, Walderez e Dulcelena**, pela doação de cepas fúngicas, treinamento e dúvidas sanadas.

À **CECON**, em especial a **Mitsue**, pela doação dos discos de antibióticos e antifúngicos.

Ao **Instituto Plantarum**, em especial do **Prof. Harri Lorenzi**, pela identificação botânica das espécies estudadas.

Ao **Técnico Libério**, pelas várias coletas de plantas medicinais.

A amiga **Nica**, pelos conhecimentos repassados para preparação de meios de cultura.

Ao **Prof. Cechinel**, pela colaboração nas análises químicas dos extratos.

Ao colegas do laboratório: **Joaquim, Íris, Neyres, Regilane, Kleber, Nicolay, Ellen e Scheila** pela companhia e apoio.

E a todos que direta e indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho, meu eterno agradecimento.

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Material botânico e análises fitoquímicas	12
2.2 Microorganismos	13
3. ENSAIOS ANTIFÚNGICOS	13
3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – (CIM)	13
3.2 Ensaio qualitativo <i>Neurospora crassa</i>	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	19
6. REFERÊNCIAS	20
7. ARTIGO ORIGINAL	22

Avaliação da atividade antifúngica e estudo do modo de ação de extratos e frações da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae)

Iberê F. Silva Junior^a, Sabina Juarez^b, Maximiliano Sortino^b, Valdir Cechinel Filho^c, Vânia F.

Noldin, Domingos Tabajara O. Martins^{a,*}

^a Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900, Cuiabá-MT, Brasil

^b Farmacognosia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional del Rosario (UNR), Suipacha, 531 Rosario, Argentina

^c Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), 88302-202, Itajaí-SC, Brasil

Resumo

Os extratos e frações da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) foram avaliados *in vitro* para determinar a atividade antifúngica contra um painel de leveduras, hialo-hifomicetos e dermatófitos, utilizando o método de microdiluição em caldo. Os extratos e frações polares exibiram atividade contra as leveduras: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans* com valores de CIM entre 250-1000 µg/mL, mas não contra fungos filamentosos e dermatófitos (CIMs > 1000 µg/mL). O modo de ação dos extratos e frações ativas foram avaliados utilizando o bioensaio de *Neurospora crassa*. Os extratos e frações ativos exibiram zonas manchadas ao redor dos discos de papel, sugerindo que o possível modo de ação antifúngica destes produtos, poderia estar associado com a inibição da síntese ou formação da parede celular fúngica.

Palavras-chaves: *Lafoensia pacari*, mangava-brava, atividade antifúngica, extratos e frações, *Neurospora crassa*.

ABSTRACT

Stem-bark extracts and fractions of *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) were in vitro assayed for antifungal activity against a panel of yeasts, hialohyphomycetes as well as dermatophytes with the microbroth dilution method. The polar extracts and fractions exhibited a broad spectrum of activity against the yeasts *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* with MIC values between 250-1000 µg/mL, but have no action against filamentous fungi and dermatophytes (MICs > 1000 µg/mL). To gain insight into the mode of action of active extracts and fractions, they were evaluated for their inhibitory activities toward the fungal cell wall, using the whole cell *Neurospora crassa* hyphal growth inhibition agar diffusion assay. The fact that all active extracts and fractions showed a blotchy zone around the paper disk, strongly suggests that the possible mode of antifungal action of these extracts could be associated with the inhibition of the synthesis or assembly of the polymers of the fungal cell wall.

KEYWORDS: *Lafoensia pacari*, mangava-brava, antifungal activity, extracts and fractions, *Neurospora crassa*.

1. Introdução

Nos últimos vinte anos têm-se observado um notável aumento do número de infecções fúngicas no mundo, associado principalmente ao crescimento do número de pacientes imunodeprimidos (Quindos, 2002). Devido a ineficácia e toxicidade das drogas antifúngicas disponíveis atualmente, o tratamento dessas micoses é muito difícil (Li et al., 1995).

O modo de ação de muitas drogas antifúngicas úteis são a inibição de algumas etapas na biossíntese do ergosterol (azóis, alquilaminas) necessária para a formação do ergosterol (anfotericina B) e a inibição na parede celular fúngica (caspofungina) (Zacchino et al., 2003; Kartsonis et al., 2003).

Visando a pesquisa de novos extratos com propriedades antifúngicas, este trabalho relata a atividade antifúngica da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae), uma árvore conhecida no Brasil como “mangava-brava” ou “pacari”, de ocorrência no Cerrado (Figura 1).



Fonte: IBGE, 2003.

Fig. 1. Região de Cerrado no Brasil onde *Lafoensia pacari* St. Hil. ocorre.

O macerado aquoso preparado da entrecasca do caule é um remédio popular na cicatrização de feridas e no tratamento da febre (Guarim Neto & Morais, 2003). Os

extratos etanólicos e metanólicos da entrecasca do caule têm mostrado possuir atividade antiinflamatória (Albuquerque, 1996a), imunoestimulante (Albuquerque, 1996b), inibidora de radicais livres (Solon et al., 2000) e inibição da produção de interleucina-5 (Rogério et al., 2003).

Nesse trabalho avaliou-se as propriedades antifúngicas de diferentes extratos e frações da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* usando-se ensaios antimicrobianos de diluição em caldo. O bioensaio de inibição do crescimento de hifas de *Neurospora crassa* foi realizado utilizando a metodologia descrita por Fukuda et al (1991). Este é um método de difusão em ágar, útil para detectar agentes cujo modo de ação está associado com a inibição da biossíntese ou formação de polímeros da parede celular (Gunji et al, 1983).

2. Materiais e métodos

2.1. Material botânico e análises fitoquímicas

A entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* foi coletada (675 g) em fevereiro de 2004, no município de Várzea Grande, no Estado de Mato Grosso, Brasil, e sua identificação botânica foi confirmada pelo MSc. Harri Lorenzi do Instituto Plantarum para estudo da Flora, em Nova Odessa - SP, Brasil. A exsicata (Nº. 35577) encontra-se depositada no Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso.

A entrecasca do caule foi limpa e seca a 40 °C, por 3 dias, até peso constante (520 g) e depois triturada. O pó pulverizado da entrecasca do caule (200 g) foi macerado na proporção (5:1) com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol 75% a temperatura ambiente por 7 dias. Cada macerado foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida. O solvente remanescente foi removido em estufa a 40 °C. Os extratos e frações foram submetidos à análises fitoquímicas preliminares por cromatografia em camada delgada e

reagentes específicos foram utilizados para evidenciar as principais classes de metabólitos secundários, como flavonóides, terpenos, esteróides, taninos, alcalóides, saponinas e quinonas (Ugaz, 1994; Block et al., 1998).

2.2. Microorganismos

A atividade antifúngica foi conduzida usando-se microorganismos provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), isolados clínicos providos pelo Centro de Referência Micológica (C, CEREMIC), Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas, Suipacha 531, (2000) Rosário/Argentina e Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil (IAL): *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Neurospora crassa* ATCC 9279, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida lusitanae* C131, *Candida kefyr* C123 e *Candida colliculosa* C122, *Aspergillus flavus* IAL 552, *Aspergillus fumigatus* IAL 640, *Microsporum canis* IAL 578, *Microsporum gypseum* IAL 579, *Trichophyton rubrum* IAL 612, *Trichophyton mentagrophytes* IAL 581, *Trichophyton tonsurans* IAL 592 e *Epidermophyton floccosum* IAL 577. As cepas foram mantidas sob inclinação em ágar Sabouraud-dextrose (OXOID) e subcultivadas, a cada 15 dias, para evitar transformações pleomórficas.

3. Ensaio antifúngicos

3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada usando microplacas de 96 poços (NCCLS M27-A, 2002-a; NCCLS M38-A, 2002-b). Diluições decrescentes foram obtidas a partir de soluções estoques dos extratos e frações, resultando em concentrações variando entre 1000 a 8 µg/mL. Ao caldo Müeller-Hinton (MICRO MED) suplementado com glicose 2%, foram adicionados 100 µL do inóculo (10^4 - 10^6 UFC/mL). Como controle positivo, adicionou-se 100 µg/mL de anfotericina B (SIGMA) ao meio de cultura. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 h a 30 °C, de acordo com o crescimento fúngico, por até 15 dias para cepas de dermatófitos. A CIM foi definida como a menor concentração dos extratos ou frações capazes de inibir totalmente o crescimento fúngico. Todos os ensaios antifúngicos foram realizados em duplicata.

3.2. Ensaio qualitativo *Neurospora crassa*

Foram preparados e autoclavados à 121 °C por 15 min, 30 mL de meio de cultura contendo 0,5% protease de peptona (DIFCO); 0,5% extrato de levedura (MERCK); 4% sacarose (MERCK) e 1,5% ágar (MERCK). Após resfriamento do meio, foi adicionado 25 µL de inóculo de *Neurospora crassa* (ATCC 9279) 1×10^7 UFC/mL, livre de hifas, a 40 °C, e então colocadas em placas de Petri (diâmetro, 9 cm). Depois da solidificação do meio, discos de papel foram aplicados. Soluções das amostras em DMSO (VETEC) foram aplicadas nos discos obtendo 100 µg/disco. Discos (CECON) contendo DMSO foram incluídos no ensaio como controle negativo. Discos contendo 30 µg de cetoconazol (CECON) foram usados como controle positivo para produzir zonas claras. As zonas de inibição foram examinadas macroscopicamente com o objetivo de visualizar-se a aparência manchada e crescimento ralo da colônia. As placas foram incubadas a temperatura ambiente, por 24 h na presença de luz ambiente. As zonas ralas foram observadas em microscópico óptico para detectar alterações morfológicas do *Neurospora crassa*.

4. Resultados e discussão

Os rendimentos dos extratos hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol 75% obtidos foram de 0,13; 0,43; 0,87 e 7,56 %, respectivamente. Do extrato acetato de etila foram obtidas as frações metanólicas (6,4 %) e acetônica (0,44 %).

As análises fitoquímicas preliminares do extrato etanólico revelaram as presenças de terpenos, esteróides, taninos e ausência de flavonóides e alcalóides, cujo resultados são similares aos relatos descritos na literatura (Solon et al., 2000; Santos et al., 2000).

A propriedade antifúngica de extratos e frações foi avaliada através do método de diluição em caldo, seguindo os delineamentos referidos pelo National Committee for Clinical and Laboratory Standards para leveduras (NCCLS M27-A2, 2002-a) e fungos filamentosos (NCCLS M38-A, 2002-b), contra um painel de leveduras, hialo-hifomicetos e dermatófitos.

Extratos com valores de CIM = 1000 µg/mL foram considerados ativos, de acordo com a 3ª Reunião de Coordenação do Projeto Iberoamericano de Busca e desenvolvimento de Antifúngicos Naturais e Análogos (X.7-PIBEAFUN/CYTED) realizada em Buenos Aires (Argentina) em 2003.

Os resultados dos ensaios de diluição em caldo (Tabela 1) mostram que apenas os extratos e as frações polares exibiram atividade contra as leveduras: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans* com valores de CIM entre 250-1000 µg/mL, mas não contra fungos filamentosos e dermatófitos (CIMs > 1000 µg/mL).

Tabela 1: Atividade antifúngica de extratos e frações de *Lafoensia pacari* contra leveduras, fungos filamentosos e dermatófitos em ensaios de diluição em caldo.

Cepas	Anfotericina B	Extratos				Frações EtOAc	
		Hexano	DCM	EtOAc	EtOH 75%	MeOH	Acetona
<i>Candida albicans</i>	1,0 ^a	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	1000
<i>Candida krusei</i>	1,0	> 1000	> 1000	500	1000	250	500
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	> 1000	> 1000	500	500	500	250
<i>Candida tropicalis</i>	0,5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	1000
<i>Candida glabrata</i>	0,5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida lusitaneae</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida kerfyr</i>	0,5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida colliculosa</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,5	> 1000	> 1000	500	500	250	250
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,5	> 1000	> 1000	500	1000	> 1000	> 1000
<i>Aspergillus niger</i>	0,5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Aspergillus flavus</i>	0,5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Microsporum canis</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Microsporum gypseum</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Trichophyton rubrum</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1,0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

^aOs resultados são apresentados como CIM (µg/mL). DCM: diclorometano; EtOH: etanol; EtOAc: acetato de etila; MeOH: metanol.

O modo de ação dos extratos e frações ativas foi avaliado pela capacidade destes em inibir a parede fúngica. Entre os métodos relacionados com este modo de ação, selecionou-se o bioensaio de *Neurospora crassa*, um método de difusão em ágar que permite detectar macroscopicamente drogas que interferem com a biossíntese ou formação da parede fúngica. *Neurospora crassa* normalmente produz hifas longas que difundem-se ou ramificam em meio de cultivo. Quando na presença de inibidores da parede celular, o crescimento das hifas é inibido e o fungo cresce como protoplasma (Fukuda et al., 1991). Macroscopicamente esses podem ser vistos ao redor dos discos como uma aparência

manchada e rala (Figura 2). A observação microscópica desta zona rala mostra mudanças morfológicas no fungo (Fukushima et al., 1993).

Os resultados obtidos no bioensaio de *Neurospora crassa* para extratos e frações ativas de *Lafoensia pacari* são mostrados na Tabela 2. O fato de que todos extratos e frações ativos mostraram zonas manchadas ao redor dos discos de papel, sugere que o possível modo de ação destes extratos e frações, poderia estar associado à inibição da biossíntese ou formação de polímeros da parede celular.

A observação microscópica das zonas ralas produzida pelos extratos e frações ativas mostraram hifas ramificadas e em zigue-zague, confirmando os resultados macroscópicos (Figura 3).

Esses resultados sugerem que os extratos etanólico e acetato de etila, assim como as frações metanólica e acetônica poderiam atuar na parede celular fúngica.

Tabela 2: Bioensaio de *Neurospora crassa* com extratos e frações de *Lafoensia pacari*.

Extratos e frações	Ensaio de <i>Neurospora crassa</i> ^(a)
Extrato acetato de etila	Manchado
Extrato etanólico	Manchado
Fração metanólica	Manchado
Fração acetônica	Manchado
Cetoconazol	Claro

^(a) Aspecto da zona de inibição

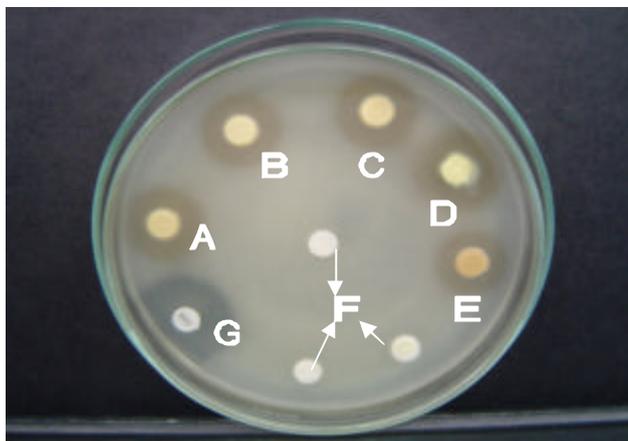


Fig. 2. Halos manchados produzidos por extratos e frações de *Lafoensia pacari* e halo claro obtido com cetoconazol no bioensaio de *Neurospora crassa*. (A e B) Extrato etanólico 75% (C) extrato acetato de etila, (D) fração acetônica, (E) fração metanólica, (F) DMSO, (G) cetoconazol.

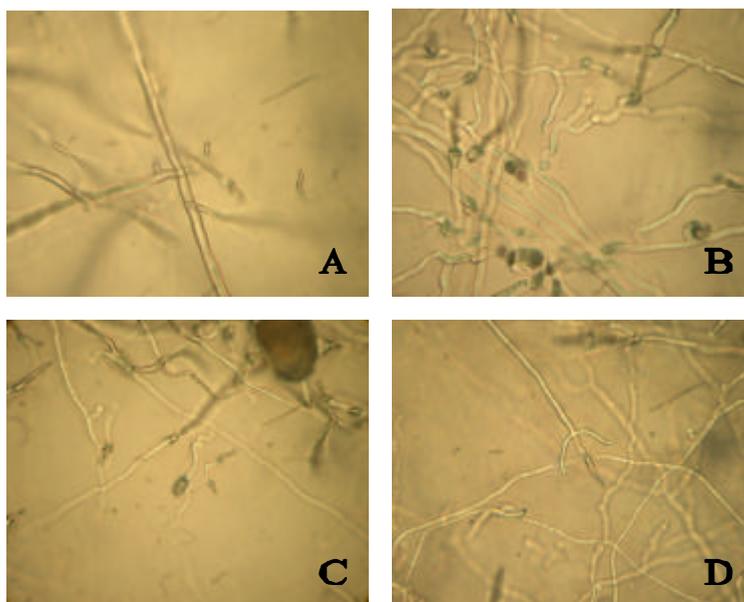


Fig. 3. Efeito do extrato etanólico 75% da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* na morfologia de *Neurospora crassa*. (A) crescimento normal em DMSO, (B) hifas em zig-zague, (C) hifas curtas e (D) hifas ramificadas.

5. Conclusão

Os extratos etanólico e acetato de etila e frações polares metanólica e acetônica obtidos da entrecasca do caule de *Lafoensia pacari* mostraram atividade antifúngica contra *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans*, importantes leveduras patogênicas oportunistas, de difícil erradicação, envolvidos em mortes de pacientes imunodeprimidos. A atividade antifúngica seletiva para a parede celular detectada no bioensaio de *N. crassa* e a observação de malformações de hifas, faz com que a *Lafoensia pacari* torne-se uma espécie brasileira atrativa para futuros estudos.

Referências bibliográficas

- Albuquerque, D.A., 1996a. Efeito do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* sobre a peritonite aguda em camundongos. Programa e Anais 3ª Reunião especial da SBPC “Ecosistemas Costeiros-Do conhecimento a gestão”, Florianópolis, SC, UFSC, 1-4 Maio.
- Albuquerque, D.A., 1996b. Efeito do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* sobre a produção de anticorpos *in vitro*. Programa e Anais 3ª Reunião especial da SBPC “Ecosistemas Costeiros-Do conhecimento a gestão”, Florianópolis, SC, UFSC, 1-4 Maio.
- Block, L.C., Scheidt, C., Quintão, N. L. M., Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V., 1998. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa*. *Pharmazie* 53, 716-718.
- Fukuda, D., Nakatsukasa, W., Yao, R., Hunt, A., Gordee, R., Zeckner, D., Mynderse, J., 1991. A45507, a complex of fungal cell wall inhibitors produced by a mold. *31st ICAAC Meeting (Chicago, Il, USA) poster # 211*.
- Fukushima, Y., Y. Sakagami, S. Marumo., 1993. β -Glucan biosynthesis inhibitors isolated from fungi as hyphal malformation inducer. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 3, 1219-1222.
- Guarim Neto, G. and Morais, R. G., 2003. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. *Acta Botanica Brasilica* 17, 561-584.
- Gunji, S., Arima, K., Beppu, T., 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural Biological Chemistry* 47, 2061-2069.
- Kartsonis, N., Nielsen, J., Douglas, C., 2003. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates* 6, 197-218.
- Li, E., Clark, A., Hufford, Ch., 1995. Antifungal Evaluation of Pseudolaric Acid B, a Major Constituent of *Pseudolarix kaempferi*. *Journal of Natural Products* 58, 57-67.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2002-a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2; Second Edition, Wayne, Pennsylvania (USA), 22 (15), 1-29.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2002-b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A; Second Edition, Wayne, Pennsylvania (USA), 22 (16), 1-27.

Quindos , G., 2002. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. Revista Iberoamericana de Micología 19, 1-4.

Rogério, A. P., Sa-Nunes, A., Albuquerque, D. A., Anibal, F. F., Medeiros, A. I., Machado, E. R., Souza, A. O., Prado, J. C. Jr., Faccioli, L. H., 2003. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. Parasite Immunology 25, 393-400.

Santos, D. Y., Luiza, F., Salatino, M., Salatino, A., 2000. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). Biochemical Systematics and Ecology 28, 487-488.

Solon, S., Lopes, L., Teixeira de Souza, P. Jr., Schmeda-Hirschmann, G., 2000. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. Journal of Ethnopharmacology 72, 173-178.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag. New York.

Ugaz, O.L., 1994. Investigación Fitoquímica. Fondo Editorial, Lima, Peru, p. 300.

Zacchino, S., Yunes, R., Cechinel, V., Enriz, R. D., Kouznetsov, V., Ribas, J. C., 2003. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: Mahendra Rai, Donatella Mares (Eds.) Plant Derived Antimycotics, Haworth Press (New York), pp. 1-47.

Evaluation of the antifungal activity and study on the mode of action of *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) stem-bark extracts and fractions.

Iberê F. Silva Junior^a, Sabina Juarez^b, Maximiliano Sortino^b, Valdir Cechinel Filho^c, Vânia F. Noldin^c, Domingos Tabajara O. Martins^{a*}

^a Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900, Cuiabá-MT, Brasil

^b Farmacognosia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional del Rosario (UNR), Suipacha, 531 Rosario, Argentina

^c Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), 88302-202, Itajaí-SC, Brasil

* Address for Correspondence and Reprint requests:

Rua Sírio Libanesa n°. 165 Apt° 602 Bairro Popular

Cep: 78045-390 Cuiabá – MT Brasil

Telephone: (55) 65 33211399 Fax number: (55) 65 36158854

e-mail: taba@terra.com.br

ABSTRACT

Stem-bark extracts and fractions of *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) were in vitro assayed for antifungal activity against a panel of yeasts, hialohyphomycetes as well as dermatophytes with the microbroth dilution method. The polar extracts and fractions exhibited a broad spectrum of activity against the yeasts *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* with MIC values between 250-1000 µg/mL, but have no action against filamentous fungi and dermatophytes (MICs > 1000 µg/mL). To gain insight into the mode of action of active extracts and fractions, they were evaluated for their inhibitory activities toward the fungal cell wall, using the whole cell *Neurospora crassa* hyphal growth inhibition agar diffusion assay. The fact that all active extracts and fractions showed a blotchy zone around the paper disk, strongly suggests that the possible mode of antifungal action of these extracts could be associated with the inhibition of the synthesis or assembly of the polymers of the fungal cell wall.

KEYWORDS: *Lafoensia pacari*, mangava-brava, antifungal activity, extracts and fractions, *Neurospora crassa*.

1. Introduction

In the last twenty years, there has been a notable increase in fungal infections all throughout the world, more so among the growing number of immunocompromised patients (Quindos, 2002). Due to the ineffectiveness or toxicity of antifungal drugs currently available, treatment of these human mycoses is very difficult (Li et al., 1995).

The mode of action of the most useful antifungal drugs, is the inhibition of some of the steps in ergosterol biosynthesis (azoles, alkylamines), the binding to ergosterol (Amphotericin B) and the inhibition of the fungal cell walls (Caspofungin) (Zacchino et al., 2003; Kartsonis et al., 2003).

As a continued work that aims to search for new extracts with antifungal properties we report here the antifungal activity of stem-bark *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae), a tree commonly known in Brazil as "mangava-brava" or "pacari", that grows in "Cerrado" regions (Figure 1).



Source: IBGE, 2003.

Fig. 1. Cerrado region within the State of Mato Grosso where *L. pacari* were collected

The maceration prepared from the stem bark is a popular remedy for the treatment of wound healing and fever (Guarim Neto and Morais, 2003). *Lafoensia pacari* stem bark ethanolic and methanolic extracts have previously been shown to possess anti-inflammatory (Albuquerque, 1996a), immunostimulatory (Albuquerque, 1996b), free radicals scavenging (Solon et al., 2000) activities and inhibition of cytokine (interleukin-5) production (Rogério et al., 2003).

We present here the antifungal properties of different extracts and fractions of *L. pacari* in broth dilution method. Further, to gain insight into the mode of action of active extracts and fractions, the whole-cell *Neurospora crassa* (Fukuda et al., 1991) hyphal growth inhibition assay was performed with them. This assay is useful to detect agents whose mode of action is associated with the inhibition of cell wall polymers synthesis or assembly (Gunji et al., 1983).

2. Materials and methods

2.1. Plant material and phytochemical analysis

Lafoensia pacari stem bark was collected (675 g), during February, 2004 in Várzea Grande area of Mato Grosso state, Brazil, and its botanical identity was confirmed by MSc. Harri Lorenzi of the Plantarum Institute, in São Paulo, Brazil. A voucher specimen (No. 35577) was deposited at the Central Herbarium of Federal University of Mato Grosso.

The stem bark was cleaned and dried at 40 °C for 3 days to constant weight (520 g) and later triturated. The dried powdered stem bark (200 g) was macerated successively with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol 75% (3:1 w/v) at room temperature for 7 days to yield a residue of 115.80 mg; 377.70 mg; 758.00 mg and 6.52 g respectively. Each macerate was separated by filtration and concentrated under reduced pressure. The remaining solvent was evaporated in stove at 40°C. Ethyl acetate extract was fractionated with methanol (6.4 g) and acetone (436 mg).

A part of each extract or fraction was submitted to phytochemical analysis by thin layer chromatography using specific reagents for determination of the main class of secondary metabolites, including flavonoids, terpenes, steroids, tannins, alkaloids, saponins and quinones (Ugaz, 1994; Block et al., 1998).

2.2. Microorganisms

Antifungal activity was conducted using microorganisms proceeding from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) or clinical isolates provided by the Centro de Referencia Micológica (C, CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha 531, (2000) Rosario/Argentina and the Institute Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil (IAL): *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Neurospora crassa* ATCC 9279, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida lusitanae* C131, *Candida kefyr* C123 and *Candida colliculosa* C122, *Aspergillus flavus* IAL 552, *Aspergillus fumigatus* IAL 640, *Microsporum canis* IAL 578, *Microsporum gypseum* IAL 579, *Trichophyton rubrum* IAL 612, *Trichophyton mentagrophytes* IAL 581, *Trichophyton tonsurans* IAL 592 and *Epidermophyton floccosum* IAL 577. The strains were maintained on slopes of Sabouraud-dextrose agar (OXOID) and subcultured every 15 days to prevent pleomorphic transformations.

3. Antifungal assays

3.1. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination

MIC were determined using microplates of 96 wells (NCCLS M27-A, 2002-a; NCCLS M38-A, 2002-b). Stock solutions of extract and fractions in DMSO were diluted to give serial twofold dilutions which were added to each medium, resulting in

concentrations ranging from 1000 to 8 $\mu\text{g/mL}$ for extract and fractions. Inocula of 100 μL (10^4 - 10^6 CFU/mL) were added to Mueller-Hinton broth (MICRO MED) supplemented with 2% of glucose. 100 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B (SIGMA) was used as positive control. The plates were incubated for 24, 48 or 72 h at 30 °C (according to the control fungus growth) up to 15 days for dermatophyte strains. MIC was defined as the lowest concentration of extracts and fractions capable to the total inhibition of the growth of fungi. All antifungal assays were tested in duplicate.

3.2. Qualitative *Neurospora crassa* assay

Thirty mL of a medium containing 0.5% proteose peptone (DIFCO), 0.5% yeast extract (MERCK), 4% sucrose (MERCK) and 1.5% agar (MERCK) was autoclaved (121 °C, 15 min), inoculated with 25 μL of spore inoculum of *Neurospora crassa* (ATCC 9279) 1×10^7 free of hypha at 40 °C and then layered on a Petri dish (diameter, 9 cm). After the medium has solidified, paper disk were applied to media. DMSO (VETEC) solutions of samples were spotted on disks 100 $\mu\text{g/disk}$. Disks (CECON) containing DMSO as negative controls were included in the assay. Ketoconazol (30 μg - CECON) were used as positive control to produce a clear zones. Zones of inhibition were examined macroscopically for hazy or mottled appearance following incubation of the plates at room temperature for 24 h with light. In those cases where hazy zones were observed, the microscopic appearances of the fungi were observed.

3. Results and discussion

Preliminary phytochemical analyses of ethanolic extract revealed the strong presence of terpenes, steroids, tannins and the absence of flavonoids and alkaloids, results

are similar to those reported in the literature (Wagner et al, 1984; Solon et al, 2000; Santos et al., 2000).

The antifungal property of extracts and fractions was evaluated with the broth dilution method following the guidelines of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards for yeasts (NCCLS M27-A2, 2002-a) and filamentous fungi (NCCLS M38-A, 2002-b) against a panel of yeast, hyalohyphomycetes as well as dermatophytes.

Extracts with MIC values = 1000 µg/mL were considered active.

Results of broth dilution assays (Table 1) showed that only the polar extracts and fractions possess antifungal activity. They inhibit the growth of the yeasts *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* with MIC values between 250-1000 µg/mL, but have no action against filamentous fungi and dermatophytes (MICs > 1000 µg/mL).

To gain insight into the mode of action of active extracts and fractions, they were evaluated for their capacity of inhibiting fungal wall. Amongst methods that deal with this mode of action, we have chosen the *Neurospora crassa* assay, an agar diffusion method which allows us to detect macroscopically drugs that interfere with the biosynthesis or assembly of the fungal cell wall. *Neurospora crassa* usually grows as long hypha in a diffuse or branched way. When it grows in the presence of certain inhibitors of its cell wall, the hyphal growth is inhibited, and fungi are grown as protoplasts (Fukuda et al., 1991). Macroscopically they can be seen as a blotchy or hazy appearance around the paper disk. The microscopic observation of this hazy zone, shows morphological changes (Fukushima et al., 1993).

Table 1. Antifungal activity of extracts and fractions of *Lafoensia pacari* against yeasts, filamentous fungi and dermatophytes in broth dilution assays

Strains	Amphotericin B	Extract				Fraction	
		Hexane	DCM	EtOAc	EtOH	MeOH	Acetone
<i>Candida albicans</i>	1.0 ^a	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	1000
<i>Candida krusei</i>	1.0	> 1000	> 1000	500	1000	250	500
<i>Candida parapsilosis</i>	0.25	> 1000	> 1000	500	500	500	250
<i>Candida tropicalis</i>	0.5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	1000
<i>Candida glabrata</i>	0.5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida lusitanae</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida kerfyr</i>	0.5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida colliculosa</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5	> 1000	> 1000	500	500	250	250
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.5	> 1000	> 1000	500	1000	> 1000	> 1000
<i>Aspergillus niger</i>	0.5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Aspergillus flavus</i>	0.5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Microsporum canis</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Microsporum gypseum</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Trichophyton rubrum</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1.0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0.5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

^aResults are presented as MIC ($\mu\text{g/mL}$). DCM: dicloromethane; EtOH: ethanol; EtOAc: ethyl acetate; MeOH: methanol.

Results obtained in the *Neurospora crassa* assay for active extracts and fractions of *Lafoensia pacari* are shown in Table 2. The fact that all active extracts and fractions showed a blotchy zone around the paper disk, strongly suggest that the possible mode of antifungal action of these extracts and fractions could be associated with the inhibition of the synthesis or assembly of the polymers of the fungal cell wall.

Table 2: *Neurospora crassa* assay of extracts and fractions on *Lafoensia pacari*

Extracts and fractions	<i>Neurospora crassa</i> assay ^(a)
Ethyl acetate extract	Hazy
Ethanol extract	Hazy
Methanol fraction	Hazy

Acetone fraction	Hazy
Ketoconazol	Clear

^(a) Aspect of the inhibition zone

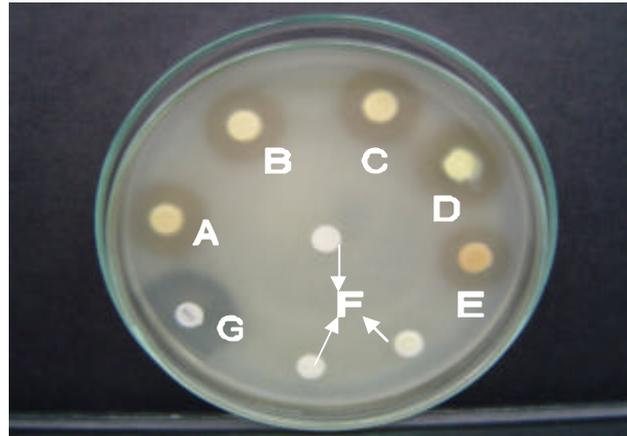


Fig. 2. Mottled halos showed by extracts and fractions of *Lafoesnia pacari* and clear halos obtained with ketoconazol in the *Neurospora crassa* assay. (A and B) EtOH extract, (C) ethyl acetate extract, (D) acetone fractions, (E) MeOH fraction, (F) DMSO, (G) ketoconazole.

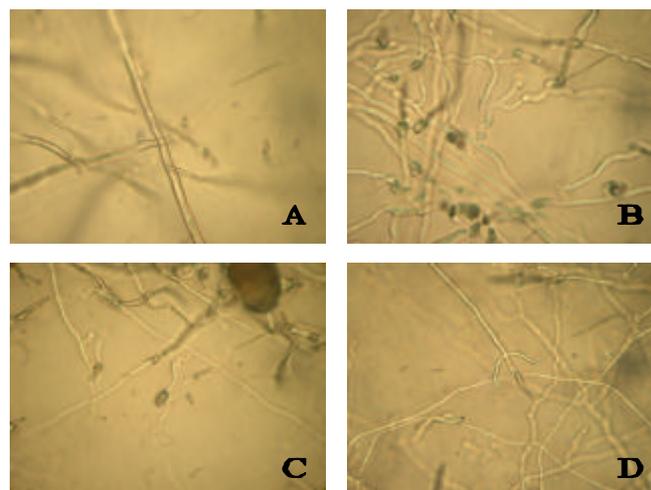


Fig. 3. Effect of extracts and fractions of *Lafoesnia pacari* on the morphology of *Neurospora crassa*. (A) normal growth, (B) hypha in zig-zag, (C) short hypha, (D) anomalous ramified hypha.

The microscopic observation of the hazy zone produced by the ethanol and ethyl acetate extracts and methanol and acetone fractions showed a shortening of the hypha as well as anomalous ramified and zig-zag hypha (Figure 3) confirming the macroscopic results. Thus the data obtained suggest that the target for the antifungal behavior of the ethanol and ethyl acetate extracts and of methanol and acetone fractions could be the fungal cell wall.

Conclusion

Extracts and fractions of *Lafoensia pacari* showed antifungal activity against *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*, important opportunistic pathogenic yeasts, which are difficult to eradicate and sometimes cause the death of immunodepressive patients, and not against another type of fungi tested.. This selective antifungal activity, the results obtained in *Neurospora crassa* assay and the hypha malformations observed, make *Lafoensia pacari* an attractive brazilian species for further studies.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES and CYTED-X for the financial support.

References

- Albuquerque, D.A., 1996a. Efeito do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* sobre a peritonite aguda em camundongos. Programa e Anais 3ª Reunião especial da SBPC "Ecossistemas Costeiros-Do conhecimento a gestão", Florianópolis, SC, UFSC, 1-4 Maio.

- Albuquerque, D.A., 1996b. Efeito do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* sobre a produção de anticorpos *in vitro*. Programa e Anais 3ª Reunião especial da SBPC “Ecossistemas Costeiros-Do conhecimento a gestão”, Florianópolis, SC, UFSC, 1-4 Maio.
- Block, L.C., Scheidt, C., Quintão, N. L. M., Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V., 1998. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa*. *Pharmazie* 53, 716-718.
- Fukuda, D., Nakatsukasa, W., Yao, R., Hunt, A., Gordee, R., Zeckner, D. and Mynderse, J., 1991. A45507, a complex of fungal cell wall inhibitors produced by a mold. *31st ICAAC Meeting (Chicago, Il, USA) poster # 211*.
- Fukushima, Y., Y. Sakagami and S. Marumo., 1993. β -Glucan biosynthesis inhibitors isolated from fungi as hyphal malformation inducer. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 3, 1219-1222.
- Guarim Neto, G. and Morais, R. G., 2003. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. *Acta Botanica Brasilica* 17, 561-584.
- Gunji, S., Arima, K., Beppu, T., 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural Biological Chemistry* 47, 2061-2069.
- Kartsonis, N., Nielsen, J., Douglas, C., 2003. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates* 6, 197-218.
- Li, E., Clark, A. and Hufford, Ch., 1995. Antifungal Evaluation of Pseudolaric Acid B, a Major Constituent of *Pseudolarix kaempferi*. *Journal of Natural Products* 58, 57-67.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2002-a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2; Second Edition, Wayne, Pennsylvania (USA), 22 (15), 1-29.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2002-b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A; Second Edition, Wayne, Pennsylvania (USA), 22 (16), 1-27.
- Quindos, G., 2002. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. *Revista Iberoamericana de Micología* 19, 1-4.

- Rogério, A. P., Sa-Nunes, A., Albuquerque, D. A., Anibal, F. F., Medeiros, A. I., Machado, E. R., Souza, A. O., Prado, J. C. Jr., Faccioli, L. H., 2003. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. *Parasite Immunology* 25, 393-400.
- Santos, D. Y., Luiza, F., Salatino, M., Salatino, A., 2000. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 487-488.
- Solon, S., Lopes, L., Teixeira de Souza, P. Jr., Schmeda-Hirschmann, G., 2000. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 173-178.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., 1984. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, New York.
- Ugaz, O.L., 1994. *Investigación Fitoquímica*. Fondo Editorial, Lima, Peru, p. 300.
- Zacchino, S., Yunes, R., Cechinel, V., Enriz, R. D., Kouznetsov, V., Ribas, J. C., 2003. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: Mahendra Rai, Donatella Mares (Eds.) *Plant Derived Antimycotics*, Haworth Press (New York), pp. 1-47.

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](#)