

ANDREA MAYUMI KOROISHI

ESTUDO *IN VITRO* E PRÉ-CLÍNICO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO EXTRATO E FRAÇÃO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Piper*
regnellii (Miq.) C. CD. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (*Piperaceae*)
PARA O TRATAMENTO DE DERMATOMICOSSES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Estadual de Maringá – UEM como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Benedito Prado Dias Filho

Maringá
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Prof. Dr. Benedito Prado Dias filho, e contou com o apoio financeiro parcial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES), Fundação Araucária e Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Toshiharu Koroishi e Marly Mieco Ishizu Koroishi, e ao meu irmão, Edson Hideki Koroishi pela paciência, incentivo e concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, por mais essa oportunidade.

Ao Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho, orientador, pela oportunidade de compartilhar a sua paciência, dedicação e sabedoria na elaboração deste trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Dr. Celso Vataru Nakamura, Dra. Tânia Ueda-Nakamura e Benício Alves de Abreu Filho pela amizade e transmissão dos seus conhecimentos científicos.

Ao professor Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez pelo apoio na parte de extração, isolamento e identificação de substâncias.

Ao professor Dr. Mauro Luciano Baesso e a aluna de doutorado Elizandra Sehn, pela contribuição nas análises de espectroscopia de fotoacústica.

À professora Dra. Maria Raquel Marçal Natali pelo auxílio no preparo e leitura dos dados histológicos, bioquímicos e hematológicos.

À professora Dra. Marli Miriam de Souza Lima pela elaboração da formulação tópica.

Em especial, as amigas que conquistei durante todos os anos de trabalho, Eliana Harue Endo, Helena Teru Takahashi, Karine Zanol Bernuci, Karoline Stuewe, Kelly Sivocy Sampaio Teixeira, Milene Valéria Lopes, Raíssa Bocchi Pedro, Patrícia Regina Santos, Silvia Cristina Heredia Vieira, que me apoiaram em todos os momentos.

Aos meus colegas que me auxiliaram no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos, Adriana Oliveira Santos, Angelo Caleare, Cleyton Eduardo Mendes de Toledo, Elizandra Britta, Érika Izumi, Fábio Bahls, Gislaine Costa, Jackeline Tiemi Guinoza, Josiane Barros Chiaramonte, Karin Rocha, Marco Antônio Costa, Mariele Caroline Nogueira Puhl, Mirian Ueda Yamaguchi, Phercyles Veiga dos Santos, Rodrigo Hinojosa Valdez, Simone Rochtaschel Foss.

À técnica do Laboratório de Laboratório de Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos, Marinete Martinez, pela amizade, confiança e pelos ensinamentos.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia Básica Adriana R. Barravieira, Maria Aparecida Manzoti, Rosana Monteiro e todos os demais funcionários, alunos e estagiários pela ajuda neste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Histologia Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Maria Eurides Carlos Cancino pelo auxílio no processamento dos materiais histológicos.

Ao meu namorado, André Luis Gasparini Loes, muito especial em minha vida, que me incentivou, apoiou, encorajou e que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Sobretudo aos meus pais, Marly e Toshiharu, que me deram o dom da vida e o ensinamento necessário para assumir a trajetória por escolhida, e meu irmão, Edson, pelo companheirismo, incentivo e compreensão

À Fundação Araucária que me concedeu uma bolsa parcial durante a elaboração do trabalho.

A os docentes, funcionários e alunos do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram significativamente neste trabalho.

“O homem erudito é um descobridor
de fatos que já existem - mas o
homem sábio é um criador de valores
que não existem e que ele faz existir.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Os dermatófitos são fungos que colonizam regiões ricas em queratina, como a camada superficial da pele e anexos. Diversos problemas dificultam o tratamento deste tipo de infecção. Baseando-se nisso, as plantas são fontes de novas moléculas mais eficazes e de baixo custo. A espécie *Piper regnellii*, pertencente à família *Piperaceae*, possui atividade contra diversos micro-organismos. O presente estudo foi desenvolvido para avaliar a atividade antifúngica de extratos e derivados das folhas de *P. regnellii*, e a aplicação destes em dois tipos de formulações, uma a base de esmalte e a outra, uma emulsão. A atividade do extrato foi de 15,6 µg/ml, e com o fracionamento para remoção da clorofila, a atividade se manteve. Baseando-se nesses resultados, foram desenvolvidas duas formulações tópicas, um esmalte contendo a fração clarificada e uma emulsão contendo o extrato, as quais foram submetidas à análise de permeação em unhas humanas e em orelha de coelho respectivamente, por espectroscopia de fotoacústica. Além disso, o esmalte foi submetido a testes *in vitro*. À concentração de 20 mg/ml inibiu totalmente o crescimento fúngico, e à concentrações inferiores, o crescimento foi reduzido. Enquanto que a emulsão foi feita avaliada toxicologicamente em coelhos. Observou-se que não houve diferença entre os grupos controle e tratado nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, possui leve potencial para formar comedos e acantose. A partir dos resultados deste estudo, as duas formulações de uso tópico têm grande potencial para o tratamento de micoses causadas por fungos dermatófitos.

Palavras-chave: *Piper regnellii*, dermatófitos, formulações tópicas, antifúngicos, espectroscopia de fotoacústica

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi which colonize regions rich in keratin, as superficial layer of skin and appendages. Several problems complicate the treatment of this type of infection. Based on this, plants are sources of new molecules more effective and with low cost. *Piper regnellii*, belonging to the family *Piperaceae*, showed inhibitory activity against various microorganisms. The present study was developed to evaluate antifungal activity of extracts and derivates from *P. regnellii* leaves, two types of formulations, nail lacquer and emulsion. Extract was fractionated to remove chlorophyll, and the antifungal activity was maintained. Two formulations were developed, a nail lacquer and emulsion containing clarified fraction and extract respectively, both were submitted to analysis of permeation through human nails and rabbit's ear by photoacoustic spectroscopy. Besides, nail lacquer was tested *in vitro*. Concentration of 20 mg/ml inhibited totally fungi growth, and at lower concentrations the growth was reduced. Emulsion was evaluated in rabbits to verify toxic effect. It was observed that there were no differences between control and treated groups concerning to biochemical and hematological parameters. This topical formulation had light potential to form comedones and acanthosis. From the results obtained in this study, two formulations of topic use have great potential for treatment of mycoses caused by dermatophytes fungi.

Key-words: *Piper regnellii*, dermatophytes, topical formulations, antifungal, photoacoustic spectroscopy

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. PELE E ANEXOS.....	12
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS	14
1.3. MICOSES SUPERFICIAIS.....	16
1.4. DERMATOMICOSES.....	17
1.5. SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS	19
1.6. FORMULAÇÕES TÓPICAS ANTIFÚNGICAS	23
1.7. PLANTAS MEDICINAIS	27
1.8. <i>PIPERACEAE</i>	31
2. OBJETIVOS.....	38
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4. Antifungal Activity and Nail Permeation of Nail Lacquer Containing <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C. CD. var. <i>pallescens</i> (C. DC.) Yunck (<i>Piperaceae</i>) Leave Extracts and Derivatives.....	48
5. ARTIGO II: TOXICOLOGICAL EVALUATION AND PERMEATION ON THE RABBIT'S EAR OF ANTIFUNGAL TOPICAL FORMULATION CONTAINING EXTRACT OBTAINED FROM <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C. CD. var. <i>pallescens</i> (C. DC.) Yunck (<i>Piperaceae</i>) AGAINST DERMATOPHYTES	61
6. CONCLUSÕES.....	86
7. ANEXOS.....	87

1.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. PELE E ANEXOS

A pele forma uma barreira biológica muito importante para o corpo humano, pois representa a primeira linha de defesa contra estímulos externos nocivos como agentes físicos (radiações), químicos (pró-oxidantes) e biológicos (infecções) (MARQUELE et al., 2005). É constituída de epiderme, derme e camadas subcutâneas. No estrato córneo, camada mais externa da epiderme, está presente a queratina, uma proteína hidrofóbica. A epiderme é composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, principalmente por queratinócitos, além de melanócitos, células de Langerhans e de Merkel, de onde se originam pêlos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas. A derme é formada, principalmente por tecido conjuntivo, além de folículo piloso, ductos de glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A presença de camadas contínuas de células epiteliais intimamente unidas e a queratina impedem a proliferação de micro-organismos (BLANCO; MAZZINI, 1948).

Diversos são os mecanismos de defesa cutânea contra infecções fúngicas que não estão envolvidos com o sistema imunológico, entre os quais, o contato direto com a luz ultravioleta, a umidade ser relativamente baixa e a competição com a microbiota deste local. Além destes fatores, o processo de renovação celular do estrato córneo contribui para a não proliferação de micro-organismos, onde a camada basal (células cuboides) juntamente com a camada espinhosa (células cuboides ou ligeiramente achatadas) são responsáveis pela renovação celular,

consequentemente, à medida que avançam para a superfície há um aumento na quantidade de queratina, as células vão se tornando achatadas com núcleo centralizado (camada granulosa) chegando ao exterior com células achatadas, mortas e sem núcleo formando o estrato córneo, removendo assim micro-organismos (WAGNER; SOHNLE, 1995). A camada granulosa possui grânulos lamelares, cujo conteúdo lipídico é envolto por membrana, quando esta se rompe libera os lipídios que são depositados no tecido, formando uma barreira contra a penetração de substâncias e a perda de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Além disso, o sebo, produzido pelas glândulas sebáceas, forma um filme protetor sobre a pele, contra o ressecamento e a quebra dos pêlos. A presença de ácidos graxos e ácido láctico no sebo inibe a presença de bactérias patogênicas e fungos, devido ao pH da pele estar entre 3 e 5 (TORTORA et al., 2004).

As glândulas sudoríparas exercem importante função no corpo, pois secretam o suor que mantém a temperatura corporal, elimina toxinas e retiram os micro-organismos da pele. Além disso, o pelo se origina do folículo piloso, constituído pela medula (células pouco queratinizadas), córtex (células queratinizadas e compactas), cutícula (células altamente queratinizadas em escamas), bainhas epiteliais e bainha conjuntiva (BLANCO; MAZZINI, 1948).

As unhas são compostas por células claras, queratinizadas, pavimentosas, com núcleos degenerados e retráídos, formando lâminas endurecidas. A unha é a grande parte visível, formando a placa ungueal, e uma parte interna, a raiz da unha. Próximo a raiz, há uma porção branca chamada de lúnula. Rodeando a unha, encontra-se o bordo ungueal, e no meio está o sulco ungueal. A porção visível da unha, encontra-se sobre o leito ungueal, abaixo da raiz e da lúnula encontra-se a matriz ungueal (origina a unha) (GENESER, 2003). Este anexo é responsável pela

proteção dos dedos contra traumas, sensibilidade e auxilia na manipulação de objetos. Algumas desordens podem ser observadas nas unhas, como a pigmentação decorrente de alguma deficiência, distrofia, hipertrofia, inflamação, infecções, descamações, entre outras (MURDAN, 2002).

1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

Os fungos foram considerados por muito tempo como vegetais, somente em 1969 passaram a ser classificados como reino Fungi. Todos os fungos são células eucarióticas, porém há uma distinção com os demais reinos por não sintetizar pigmentos derivados da fotossíntese, possuir quitina em sua parede celular e armazenar glicogênio como fonte de reserva. Além disso, são agrupados em dois tipos celulares, leveduriformes e filamentosos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As leveduras são unicelulares, têm a função reprodutiva e vegetativa. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento da célula-mãe, formando os blastoconídios, podendo estes se desprender e formar uma nova célula ou permanecer ligado à célula de origem, formando pseudohifas. A temperatura de crescimento ideal é de 37°C, suas colônias apresentam-se cremosas ou pastosas semelhantes às colônias bacterianas (TORTORA et al., 2004).

Os fungos filamentosos são multicelulares, tubulares (hifas) podendo ser septados ou não-septados (cenocíticos). O micélio é o conjunto de hifas, diferencia-se em reprodutivo e vegetativo. O micélio reprodutivo encontra-se na superfície aérea da colônia, a reprodução pode ser sexuada ou assexuada, de acordo com a espécie, dando origem aos conídios e esporangiósforos (propágulos assexuados), e

basidiósporos e ascósporos (propágulos sexuados). O micélio vegetativo está em contato direto com o substrato, tem a função de captar os nutrientes e de promover a sustentação. As colônias apresentam-se como algodonosas, aveludadas, pulverulentas, apresentando pigmentações variadas e crescem a temperatura entre 25 a 28 °C (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As doenças causadas por estes micro-organismos estão associadas aos elementos fúngicos ou aos seus metabólitos, são classificadas como reações alérgicas (proteínas), tóxicas (micotoxinas) e infecções (micoSES) (BARRET, 2002). Durante uma reação alérgica, o hospedeiro é sensibilizado por antígenos fúngicos presentes no ar ou de localização endógena no hospedeiro, promovendo a asma brônquica e rinite alérgica. Os principais gêneros que causam a reação são *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Enquanto a intoxicação ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por fungos microscópicos, produtores de micotoxinas (micotoxicose) ou de fungos macroscópicos venenosos (micetismo) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os principais gêneros produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, entre outros, e as micotoxinas mais conhecidas são as aflatoxinas, constatadas pela primeira vez em 1960, onde milhares de aves morreram após a ingestão de ração contaminada por *Aspergillus flavus*. As micotoxinas agem principalmente na função renal e hepática, fatal em alguns casos. O micetismo caracteriza-se pela ingestão de cogumelos venenosos, principalmente dos gêneros *Amanita* e *Psilocibe*, promovendo a perturbação gastrointestinal, hepáticas, levando à morte, ou alucinações, induzidas por fungos alucinógenos. A infecção é decorrente do agente ser patógeno primário ou oportunista (LOPES et al., 2005).

1.3. MICOSES SUPERFICIAIS

O termo micose foi citado pela primeira vez em 1856 por Rudolf Virchow (1821 – 1902) e significa uma doença infecciosa causada por fungos (LACAZ, 2009). As micoes são classificadas de acordo com a região que acometem no hospedeiro, portanto se dividem em micoes superficiais (pele e anexos), micoes subcutâneas (pele e tecidos subcutâneos), micoes sistêmicas (órgãos internos e tecidos) e micoes oportunistas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Ultimamente, este tipo de infecção microbiana está se tornando cada vez mais preocupante, em função do uso terapêutico de antibióticos de amplo espectro, tratamentos quimioterápicos e imunossupressores, e o avanço da AIDS (WALSH et al., 2004).

As micoes superficiais se localizam em regiões cutâneas e seus anexos, como pêlos, unhas e cabelos, e subdividem-se em micoes superficiais estritas, tinja nigra, piedras, dermatomicoses e micoes mucocutâneas (WAGNER; SOHNLE, 1995).

As micoes superficiais estritas são conhecidas como pitiríase versicolor com sinônimas micoe de praia, *Tinea versicolor* e impingem de praia. *Malassezia furfur* é o principal agente, promovendo manchas bem delimitadas de coloração variável e localizadas (pescoço, tronco e abdômen) que são proeminentes após exposição ao sol (RINCÓN et al., 2005). Enquanto a *Tinea nigra* localiza-se preferencialmente na palma das mãos (estrato córneo) com lesões papulosas de coloração negra, tem como agente *Cladosporium werneckii*. As piedras se dividem em branca e preta. A primeira localiza-se na região pubiana, axilar e facial (pêlos). Caracteriza-se por

nódulos brancos e de consistência mole, causada por *Trichosporon beigelii*. Enquanto, espécies de *Piedraia*, são responsáveis pela piedra preta e instalam-se nos cabelos. Os nódulos são negros ou esbranquiçados, rígidos e muito aderentes. Além disso, as micoses cutâneas são representadas pelas candidíases que ocorrem em várias partes do corpo. São infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida* (LACAZ, 2009). Os fungos dermatófitos são os responsáveis pelas dermatomicoses, explicada com maiores detalhes no próximo item.

1.4. DERMATOMICOSSES

Os fungos dermatófitos são os responsáveis por essa patologia, comumente referida como “ringworm” (ESQUENAZI et al., 2004; HARRIS, 2002). Pertencem ao reino Fungi, divisão Deuteromycetes, classe Coelomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae e gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidemophyton*. Weitzman e Summerbell (1995) relatam que Raimond Sabouraud (1890) definiu taxonomia, morfologia, métodos de cultivo e terapia contra as infecções causadas por estes fungos. Primeiramente, classificou em quatro gêneros, *Achorion*, *Epidemophyton*, *Microscporum* e *Trichophyton*, posteriormente, em 1934, Chester Emmons atualizou a taxonomia elaborada por Sabouraud, agrupando assim em três gêneros atuais.

Os dermatófitos infectam principalmente a área cutânea, cujo tecido possui grande quantidade de queratina depositada. São conhecidos como queratinofílicos, pois degradam a queratina e a utilizam como principal fonte de nutriente. Outros recursos são essenciais para o desenvolvimento como carboidratos, proteínas,

fósforo, cloro, enxofre, sódio, potássio, cálcio e magnésio que estão presentes em sais como o fosfato monopotássico, fosfato dipotássico, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio e cloreto de potássio (ESTEVES, 1990).

Dependendo do local anatômico e o agente etiológico envolvido, as dermatomicoses são designadas com conceitos clínicos diferentes, iniciado com o termo *Tinea* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). *Tinea pedis* é a mais comum das dermatomicoses. Os principais fungos que causam este tipo de dermatomicose são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* e *Epidemophyton floccosum*. A pele caracteriza-se com descamação, fissuras e pulverulenta, podendo desenvolver a hiperqueratose e infecção secundária causada por bactérias Gram-negativas, induzindo lesões exudativas (WAGNER; SOHNLE, 1995). *Tinea corporis* localizada no tronco, ombros e membros, manifesta-se com placas escamosas e arredondadas, e bordas elevadas e eritematosas (STRATEN et al., 2003). Enquanto que *Tinea cruris* está presente principalmente na virilha, região perianal e coxa, frequentemente encontrada em homens adultos e os principais agentes são *T. rubrum* e *E. floccosum*, promovendo lesões eritematosas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Além da pele, os dermatófitos podem atingir os pêlos, como exemplo *Tinea capitidis* que se localiza no couro cabeludo, e apresenta-se com descamação difusa, alopecia sem inflamação e com pontos negros, e foliculite. Ressalta-se que este tipo de micose, é mais prevalente em crianças do que em adultos, em função da mudança de pH e a oleosidade presente nessa região (REBOLLO et al., 2008). Outra região, porém menos frequente, é a barba, denominada então de *Tinea barbae*. Os fungos infectam os pêlos formando nódulos e lesões exudativas,

podendo se agravar na presença de foliculite bacteriana e encravamento dos pêlos (STRATEN et al., 2003).

A onicomicose, também conhecida como *Tinea unguium*, possui como representantes principais *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Este tipo de micose caracteriza-se como unhas friáveis, corroídas, secas, escamosas, com estrias longitudinais, podendo haver separação do limbo e do leito da unha. Outros fungos das espécies *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Candida albicans*, *Rhodotorula* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporum*, entre outros, também podem causar esta infecção (LACAZ, 2009; KAZEMI, 2007).

1.5. SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS

Há uma grande dificuldade em tratar infecções fúngicas superficiais, devido ao uso inespecífico, alto custo e longo período de tratamento (ODDS, 2003b). Outro fator importante é a característica da célula fúngica ser eucariótica, ou seja, apresenta uma grande similaridade com a célula dos mamíferos, exigindo assim, que as substâncias antifúngicas tenham uma seletividade tóxica apenas ao patógeno e não ao hospedeiro (HARRIS, 2002)

Segundo Odds (2003b) a busca de novos agentes antifúngicos deve se basear em macromoléculas essenciais para a sobrevivência, crescimento, fatores de virulência e morfogênese celular fúngica.

Diversas são as classes de substâncias utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas superficiais causadas por dermatófitos, entre as quais a

griseofulvina, princípio ativo mais usado, seguido de azóis e alilaminas. Enquanto, para micoses profundas, estão os poliênicos, os azóis e atualmente, as equinocandinas (HECTOR, 2005).

A griseofulvina (Fig. 1, 1) é um metabólito produzido por *Penicillium griseofulvum*, descoberto em 1939. Seu mecanismo de ação é inibir a função dos microtúbulos interferindo no processo mitótico, na síntese de ácido nucléico e nas funções citoplasmáticas (HECTOR, 2005; ODDS, 2003a; ODDS, 2003b; ZHANG et al., 2007).

Os azóis são muito utilizados na forma farmacêutica de uso tópico, atuam na enzima 14- α -lanosterol demetilase, a qual impede a conversão de lanosterol em ergosterol, acarretando assim em um aumento na permeabilidade e rigidez da membrana, levando a inibição do crescimento e replicação fúngica (ZHANG et al., 2007). Canuto e Rodero (2002) propuseram que espécies de *Candida* têm maior probabilidade de desenvolver resistência a essa classe de antifúngicos.

Foster et al. (2005) verificaram o efeito de fluconazol (Fig.1, 2) no tratamento de crianças com *Tinea capitis*. O fármaco quando utilizado por três semanas, promoveu a cura de 44,5% do grupo tratado, e quando utilizado por seis semanas, 49,6% do grupo tratado apresentou-se curado. Porém, foram verificados efeitos adversos durante o tratamento, como anormalidades hepáticas, hipotensão postural, prurido, dor abdominal, gastroenterites e vômitos.

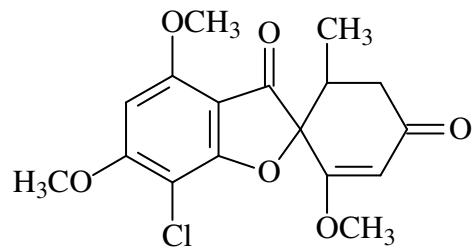
Outras classes de antifúngicos também atuam na rota biossintética do ergosterol, entre elas as alilaminas e as morfolinas. Como representante principal do primeiro grupo, ressalta-se a terbinafina, que atua na enzima esqualeno epoxidase, inibindo-a, sendo muito eficaz em fungos filamentosos e ineficiente para leveduras patogênicas (ODDS, 2003b).

Nimura et al. (2000) compararam a atividade antifúngica *in vitro* das alilaminas. terbinafina e butenafina. Estas substâncias apresentam maior atividade fungicida contra espécies de *Trichophyton*, e com menor intensidade, para *C. albicans* e *M. furfur*. Além disso, verificaram a atividade de cetoconazol (Fig. 1, 3) e neticonazol, os quais foram fungistáticos para *C. albicans* e *M. furfur*, inativo para *T. rubrum*. A amorolfina foi fungicida contra todos os fungos citados.

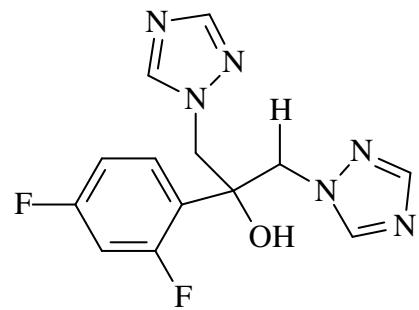
Porém, Garg et al. (2006) observaram que a terbinafina foi altamente eficaz contra isolados clínicos de *Candida* na Índia. Aproximadamente 76% dos isolados foram sensíveis, enquanto que para as demais drogas, os isolados foram sensíveis a 100% para anfotericina B, 56% para itraconazol, 40% para cetoconazol e 36% para fluconazol.

A classe das morfolinas, em destaque a amorolfina, tem ação na enzima Δ^{14} -redutase e Δ^8 - Δ^7 -isomerase, da via de biossíntese de ergosterol (ODDS, 2003b). Estas substâncias possuem amplo espectro de ação, além dos dermatófitos, atuam também contra *Candida* e outros fungos filamentosos como *Henderson-ula* e *Scopulariopsis* (ZAUG, 1995).

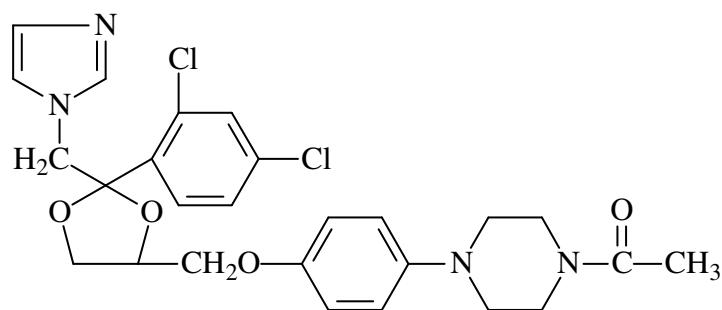
Entre os poliênicos, a anfotericina B (Fig. 1, 4) e nistatina (Fig. 1, 5) são os principais representantes. São altamente seletivos à célula fúngica, pois atuam na ligação irreversível com o ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e promovendo a liberação do conteúdo intracelular (ZHANG et al., 2007).



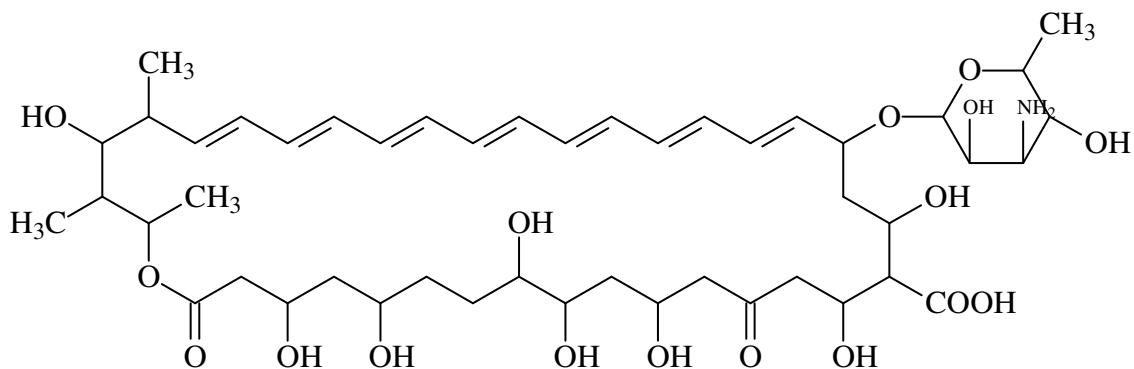
(1)



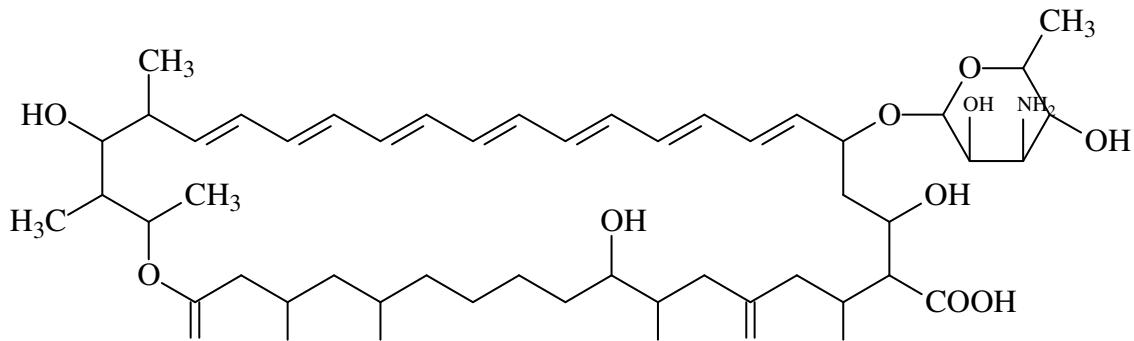
(2)



(3)



(4)



(5)

Figura 1 Estrutura química de fármacos antifúngicos utilizados no tratamento de micoses. (1) griseofulvina, (2) fluconazol, (3) cetoconazol, (4) anfotericina B, (5) nistatina.

1.6. FORMULAÇÕES TÓPICAS ANTIFÚNGICAS

Definem-se fármacos de uso tópico como sendo aqueles que são administrados em uma região externa à superfície do corpo. As formas farmacêuticas utilizadas com essa finalidade são soluções, tinturas, loções, cremes, pomadas, géis, esmaltes e pastas (BUHSE et al., 2005).

Para o tratamento de doenças infecciosas cutâneas é necessário que o princípio ativo seja liberado no local da infecção a uma concentração adequada para ter o efeito farmacológico. O princípio ativo e o excipiente devem ter características físico-químicas adequadas de permeação. Terapia tópica é de grande utilidade no tratamento de micoses superficiais, como *Tinea corporis*, pitiríase versicolor, entre outras. Porém, quando a infecção atinge folículos pilosos, como a *tinea capitis*, esse tratamento não é o mais correto. No entanto, outros fatores podem contribuir para que o tratamento seja mais eficaz, no caso de *Tinea pedis* ou pé-de-atleta, como o pé é uma região onde a umidade se faz muito presente, é necessário que o local esteje seco antes da aplicação do fármaco. Outro fator importante, como pode haver proliferação bacteriana no local, faz-se necessário a combinação com um antibacteriano (WEBSTER, 2001).

Os fungos dermatófitos durante o processo infeccioso se instalam nas camadas mais externas da epiderme, sendo assim, um agente antifúngico deve ser liberado no estrato córneo para que possa inibir o crescimento ou matar os mesmos (PERSHING et al., 1994).

A terapia tópica não é um processo invasivo, o fármaco deve agir no local da infecção, possuir baixos efeitos colaterais e interações com outras substâncias,

permitindo assim, melhor adesão e redução de custos durante o tratamento. O esmalte é uma boa opção de tratamento para onicomicoses, pois através de um sistema de liberação permite melhor penetração da droga (EFFENDY, 1995; MURDAN, 2002).

Pièrard et al. (1995) analisaram a atividade de terbinafina (Fig. 2, 1) e itraconazol (Fig. 2, 2) no estrato córneo com os seguintes tratamentos, 200 mg de itraconazol duas vezes diariamente, e 250 mg de terbinafina por dia. Observou-se que a 200 mg de itraconazol apresentou uma resposta mais rápida do que a terbinafina, contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, enquanto que para *C. albicans*, a terbinafina não apresentou atividade.

Repka et al. (2004) utilizaram gel contendo cetoconazol 0,125% e carbopol 974P NF em unhas. Foi verificado que o gel teve uma boa bioadesão, cerca de 2,5 vezes maior que o controle (tratado com água destilada) e apresentou 60% de permeabilidade.

Davies (2006) selecionou 40 pessoas com onicomicose, 61% tinham infecção por *T. rubrum* e 34,6% com *T. mentagrophytes*. Depois de 12 semanas de tratamento com pomada contendo clotrimazol 1%, foi confirmado cura completa de todos os pacientes.

Fang et al. (2002) verificaram a absorção percutânea *in vitro* de hidrogéis contendo nonivamide e vários polímeros, como a quitosana e carboximetilcelulose sódica. Dados experimentais sugerem que a quitosana presente aumentou a permeabilidade de nonivamide na pele de ratos Wistar.

Osborne et al. (2004) verificaram a atividade de terbinafina em pó em unhas humanas infectadas com *T. rubrum*. A concentração fungicida foi de 4 µg/ml e 1 µg/ml depois de uma e quatro semanas de incubação, respectivamente.

O ciclopirox (Fig. 2, 3) pertencente à classe dos antifúngicos hidroxipiridona, age na quelação de metais polivalentes catiônicos como o Fe^{+3} e na inibição de enzimas metalo-dependentes, cuja função é degradar peróxidos tóxicos. Gupta et al. (2000) verificaram que a atividade de um esmalte contendo ciclopirox a 8% foi efetivo no tratamento de onicomicoses causada por *T. rubrum*. Contudo, outros estudos revelaram que este composto possui atividade sobre outros fungos, como espécies de *Candida* e não dermatófitos. É considerado seguro, pois no estudo, o ciclopirox apresentou baixos efeitos colaterais. Bohn e Kraemer (2000) averiguaram o espectro de atividade do ciclopirox e constataram que foi efetivo a diversos fungos (leveduras, dermatófitos e não dermatófitos). A concentração de 0,49 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inibiu somente *T.rubrum* e *M. canis*, com o aumento da concentração o espectro de ação aumenta também.

A amorolfina (Fig. 2, 4) é um importante princípio ativo usado somente em formulações tópicas no tratamento de micoses superficiais. Na forma farmacêutica de esmalte, apresentou ótima penetração em concentrações clinicamente efetivas e efeito prolongado, ou seja, uma simples aplicação garantiu a efetividade por uma semana (MARTY, 1995; ZAUG, 1995).

Alguns medicamentos ou cosméticos de uso tópico podem causar a formação de comedo, sendo este, uma das primeiras etapas do processo de inflamação. A comedogênese consiste em alterações que ocorrem durante o processo de queratinização (ROMANOWSKI; SCHUELLER, 1997; FARRAR; INGHAM, 2004). Os comedos são formados pela junção de lipídeos e queratina dentro da porção média do folículo piloso, com a expansão gradual do comedo, o folículo se dilata e ocorre também a atrofia do epitélio folicular e glândulas sebáceas (COTRAN et al., 1991).

Várias são as técnicas de análise de permeação de formulações tópicas, entre elas a espectroscopia de fotoacústica, que é uma técnica não invasiva e auxilia na determinação de permeação de compostos através da pele e unhas, possibilitando a análise de amostras sem a sua destruição e a necessidade de preparação prévia. A técnica consiste na incidência de luz sobre a amostra, excitando as moléculas, que ao decaírem o estado energético transforma o calor em ondas no ar da célula fotoacústica gerando assim, o som, que é captado por um microfone. É possível traçar um perfil de profundidade do material permeado na amostra, baseado na seguinte equação, $\mu_s = (d/\pi f)^{1/2}$, que determina o comprimento de difusão térmica (μ_s), f a freqüência utilizada e d a difusividade da amostra. De acordo com a região do espectro que houve alteração do sinal, quando comparado com o controle, é possível determinar a profundidade que a formulação foi absorvida (SEHN et al., 2009). Nuglisch et al. (2005) verificaram que duas formulações contendo ciclopirox apresentaram ótima permeação em unhas humana por essa técnica de espectroscopia. Truite et al. (2007) avaliaram a penetração percutânea em coelhos, de formulações fitoterápicas para o tratamento do vitiligo.

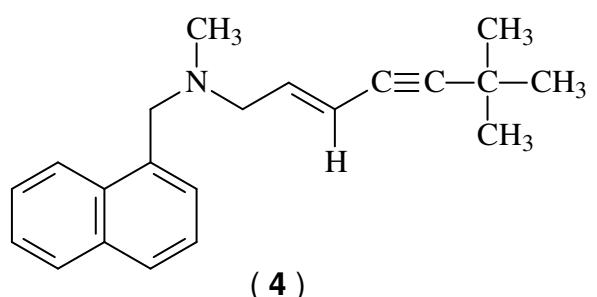
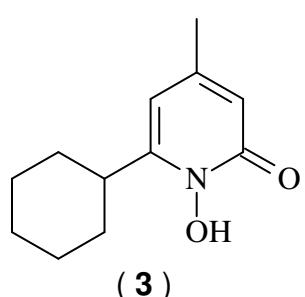
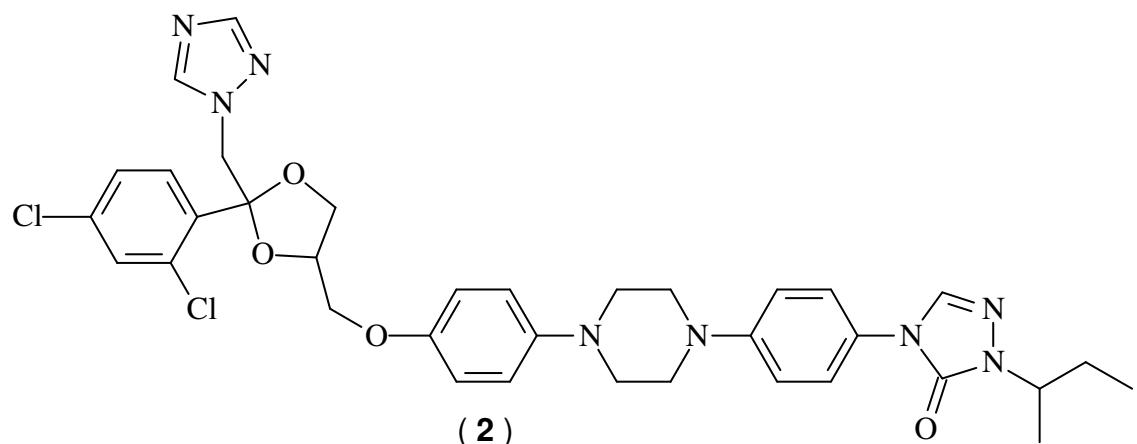
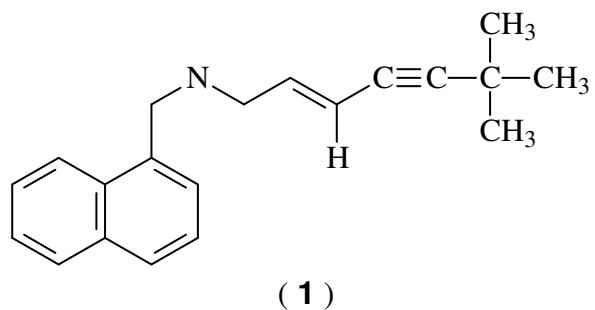


Figura 2 Antifúngicos usados em formulações tópicas. (1) terbinafina, (2) itraconazol, (3) ciclopirox, (4) amorolfina.

1.7. PLANTAS MEDICINAIS

Atualmente, os fármacos utilizados na clínica foram descobertos pelo estudo de plantas e outros produtos naturais baseados no uso popular com finalidades

terapêuticas, e está em contínuo processo de novas descobertas. Há uma infinidade de plantas, porém, poucas foram validadas do ponto de vista farmacológico e fitoquímico (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). A busca de novas drogas deve ser feita devido à emergência de agentes nos últimos 30 anos, como o vírus da AIDS, vírus Ebola, vírus H1N1, vírus H5N1, e a resistência de micro-organismos a fármacos. Mecanismos como inativação enzimática, bomba de efluxo (expulsão do antibiótico), modificação estrutural do alvo de ação, inespecificidade de alvos, diminuição da captação de antibióticos permitem que o micro-organismo se torne resistente (DEMAIN, 2009). Além da resistência, outros fatores corroboram a necessidade para o desenvolvimento de novas drogas, como limitações terapêuticas, toxicidade, interações medicamentosas e biodisponibilidade insuficiente da droga.

A interação das plantas com o ambiente e o mecanismo de defesa contra micro-organismos e parasitas invasores são responsáveis pela produção de metabólitos secundários, os quais são importantes candidatos a agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2009).

Hussain et al. (2003), analisaram a atividade do óleo essencial de *Citrus aurantifolia* e *Mentha viridis* contra isolados clínicos de pacientes com *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. A concentração inibitória mínima destes óleos variou entre 56 e 112 µg/ml. Foi verificado também a inibição da enzima queratinase presente nestes fungos, e o óleo inibiu a concentração entre 64 e 72 µg/ml.

A partir do bulbo de *Allium cepa* L., foi obtido o extrato aquoso, preparado nas concentrações entre 0,78 a 50% (v/v em meio de cultura) para os testes microbiológicos. A concentração de 3,12% apresentou efeito fungistático em *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Foram observadas anomalias morfológicas nas hifas,

ou seja, teve ação em componentes externos e internos da membrana, como núcleos e mitocôndrias (GHAHFAROKHI et al., 2004).

A espécie *Vernonanthura tweedieana* é utilizada na medicina popular paraguaia para tratar doenças de pele, como ferimentos, infecções fúngicas e eczema. A substância 6-cinamoil-1-hidroxieudesmo-4-en-3-um, obtida do decocto das raízes, apresentou atividade fungicida e fungistática entre 4 e 32 µg/ml para *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *T. mentagrophytes*. O composto foi mais ativo contra *T. mentagrophytes* com CIM e CFC de 4 µg/ml (PORTILLO et al., 2005).

Park et al. (2009) verificaram a atividade contra *T. mentagrophytes* de quatro óleos essenciais, citral, eugenol, nerolidol e α-terpinol. O citral apresentou melhor atividade, onde a concentração de 0,1 mg/ml inibiu o crescimento de hifas, enquanto que os demais óleos promoveram somente distorção nas hifas na concentração de 0,2 mg/ml de eugenol, 0,4 mg/ml de nerolidol e 1 mg/ml de α-terpinol.

Biomas importantes, como o Cerrado brasileiro agrupa aproximadamente 6000 espécies catalogadas. O uso popular dessas plantas tem contribuído para a descoberta de extratos e compostos com diversas atividades biológicas, entre as quais, a antifúngica. Os extratos obtidos das espécies originadas dessa região *Kielmeyera coriacea*, *Renealmia alpinia*, *Stryphnodendron adstringens* e *Tabebuia caraiba* apresentaram atividade contra *T. rubrum*, com valores de MIC variando entre 23,23 e 170,39 µg/ml, enquanto que para *C. albicans* apresentaram pouca atividade (SILVA et al., 2009). Em contrapartida, Ishida et al. (2006) verificaram que a presença de taninos condensados na subfração cetônica obtida da espécie *S. adstringens* são responsáveis pela atividade contra *C. albicans* à concentração de 7,8 µg/ml.

Além disso, outro bioma muito importante e rico em plantas medicinais é a Caatinga. No estudo realizado por Cruz et al. (2007), espécies utilizadas popularmente com finalidades terapêuticas tiveram seu uso comprovado, como *Ziziphus joazeiro* Mart. (enxaguatório bucal para candidíase e uso tópico para micoses superficiais), *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (enxaguatório bucal para candidíase), *Bumelia sartorum* Mart. e *Hymenea courbaril* L., ambos de uso tópico para tratar micoses superficiais.

Svetaz et al. (2010) analisaram 327 espécies de plantas de sete países latino-americanos. As plantas foram agrupadas em espécies já relatadas com atividade antifúngica e não relatadas. Dentre os grupos relatados estão algumas espécies da família Arecaceae, Asteraceae (*Mikania periplocifolia* Hook. & Arn.), Combretaceae, Fabaceae, Polygonaceae, Sapindaceae, Winteraceae (*Drimys winteri* J. R. Forster & G.) e Zingiberaceae, contra *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*. Com relação ao outro grupo, destacam-se Asteraceae (*Critonia morifolia* (Mill.) R. M. King), Bromeliaceae, Euphorbiaceae, Humiriaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Winteraceae (*Drimys brasiliensis* Miers).

Glaucium grandiflorum é usada na medicina tradicional iraniana para dermatite. O extrato obtido a partir das folhas foram incorporados em concentrações variadas entre 1 a 5% em creme base, com a finalidade anti-inflamatória e analgésica. A concentração de 5% apresentou efeito similar ao gel de piroxicam (anti-inflamatório) enquanto que a atividade analgésica foi menos efetiva do que a pomada de salicilato de metila (analgésico) (MORTEZA-SEMNANI et al., 2004).

Ordóñez et al. (2009) utilizaram o extrato das folhas de *Sechium edule* (Cucurbitaceae), planta popularmente usada no México. O extrato apresentou atividade antibacteriana, com MIC variando entre 20 a 40 µg/ml, e atividade

antifúngica, entre 20 – 800 µg/ml. Baseando nesses resultados, foram formulados, solução e hidrogel contendo sulfato de gentamicina, hidrogel base e hidrogel contendo fluido de extrato a 0,24%. Em especial, o hidrogel contendo extrato foi ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *Aspergillus* spp.

1.8. PIPERACEAE

A família *Piperaceae* pertence à classe Magnolipsida, subclasse Magnoliidae, subordem Nymphaeiflorae e ordem Piperales (MACRAE; TOWERS, 1984; SANTOS et al., 2001 apud PESSINI, 2003a). Nas regiões tropicais e subtropicais, aproximadamente 2000 espécies representam os quatro maiores gêneros da família, *Piper*, *Peperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia*. Há grande variedade de grupos de compostos sintetizados por essa família, como amidas, fenilpropanóides, lignanas e neolignanas, ácidos benzóicos, terpenos e cromonas, alcalóides, policetídeos entre outros, (KATO; FURLAN, 2007; STÖHR et al., 2001). Diversas são as atividades atribuídas a ela, como antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antiviral, antioxidante, moluscicida e antileishmanial (JOHAN et al., 2008).

O gênero *Piper* possui aproximadamente 700 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, tanto no hemisfério norte quanto no sul, e popularmente são usadas como plantas medicinais (PARMAR et al., 1997).

Freixa et al. (1998) relataram a atividade de várias espécies, entre as quais *Piper elongatum* C. DC. e *Piper fulvescens* C. DC. Extratos obtidos das suas folhas

utilizando diclorometano inibiram o crescimento de *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*.

P. fulvescens C. DC., espécie nativa do Paraguai, é popularmente usada para tosse, bronquite, asma e gastrite. A partir das folhas dessa espécie foram isoladas neolignanas que foram submetidas a testes antifúngicos. Verificou-se que eupomatenóide-5 (Fig. 3, 2) não apresentou atividade contra *T. mentagrophytes*, entretanto, eupomatenóide-6 (Fig. 3, 3) e conoocarpano (Fig. 3, 4) tiveram ótima atividade, com valores de MIC de 1 e 8 µg/ml, respectivamente, e para *M. gypseum*, de 0,5 e 16 µg/ml. Enquanto para *C. albicans* e *C. neoformans*, os eupomatenóides foram inativos e apenas o conoocarpano foi ativo, com valores de 8 e 16 µg/ml, respectivamente (FREIXA et al., 2001).

Piper regnellii utilizada popularmente para tratamento de feridas, infecções, inflamações, entre outras, teve a atividade comprovada contra vários tipos de micro-organismos. Segundo Holetz et al. (2002) em um estudo de avaliação de plantas popularmente utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas, verificaram que o extrato das folhas de *P. regnellii* apresenta CIM de 7,8 µg/ml para *S. aureus*, 15,6 µg/ml para *Bacillus subtilis*, 250 µg/ml para *P. aeruginosa*, 125 µg/ml para *Candida krusei*.

Schmidt et al. (2009) analisaram plantas brasileiras usadas tradicionalmente no tratamento de feridas, constataram que o extrato hexânico de *P. regnellii* foi o mais ativo contra *B. subtilis*, na concentração de 100 µg/disco promoveu zona de inibição de 12 mm. Outras atividades já foram relatadas para a espécie *P. regnellii* contra fungos dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *M. canis* (KOROISHI et al., 2008), e protozoários *Trypanossoma cruzi* (LUIZE et al., 2006) e *Leishmania amazonensis* (VENDRAMETTO et al., 2010).

Pessini et al. (2003b) isolaram neoglinanas de *P. regnellii*, conocarpano, eupomatenóide-3 (Fig. 3, 1), eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6. Exceto o eupomatenóide-3, todas as outras neolignanas apresentaram ótima atividade com MIC variando entre 1,56 a 6,25 µg/ml para *S. aureus*, *B. subtilis* e *Escherichia coli*. O composto eupomatenóide-5 foi o mais ativo contra *S. aureus* com MIC de 1,56 µg/ml. Luize et al. (2006) também analisaram a atividade das neolignanas citadas anteriormente, verificaram que eupomatenóide-5 foi o composto mais ativo contra a forma epimastigota de *T. cruzi* e não apresentou citotoxicidade em células Vero.

Além da atividade antifúngica, outras atividades biológicas são atribuídas às espécies de *Piper*. *Piper porphyrophyllum* N.E. Br., nativa da Malásia, possui ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (WIART et al., 2004). Na China, espécies de *Piper* são usadas para doenças reumáticas e do trato respiratório. Stöhr et al. (2001) verificaram que *Piper kadsura*, na concentração de 10 µg/ml inibiu a atividade de 5-lipoxigenase, enquanto que outras espécies como *Piper boehmeriifolium* var. *tonkinense*, *Piper laetispicum* e *Piper martinii* além de *P. kadsura*, inibiram a atividade de 5-lipoxigenase como cicloxigenase-1, enzimas importantes no metabolismo do ácido aracônico. Neolignanas de *P. kadsura* apresentaram atividade anti-neuroinflamatória, entre elas “piperkadsin C” (Fig. 3, 5) e futoquinol (Fig. 3, 6) inibiram a produção de óxido nítrico em células da micróglia e as demais neolignanas tiveram ação moderada na produção de óxido nítrico em células BV-2 (KIM et al., 2010).

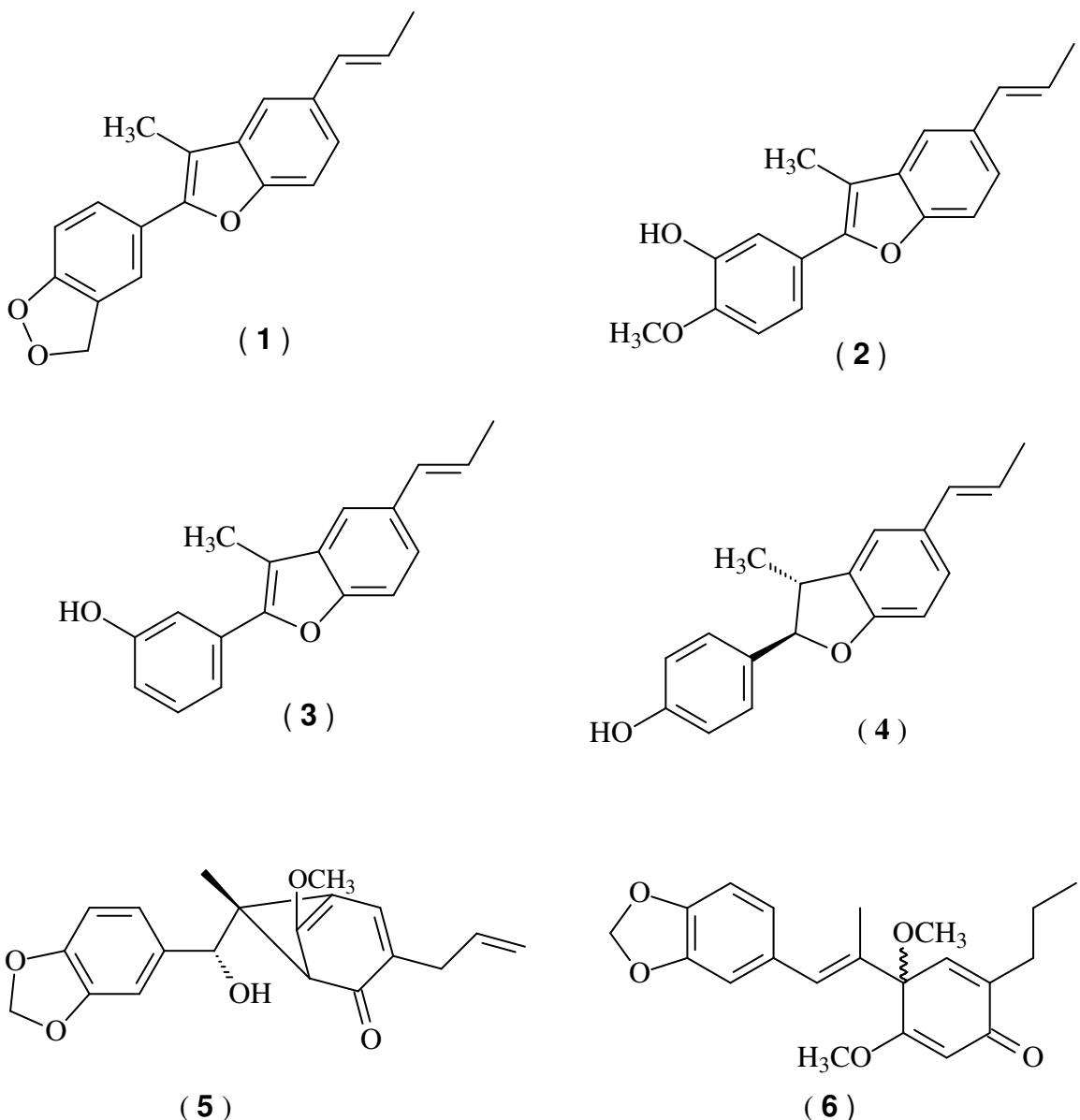


Figura 3 Neolignanas isoladas de espécies de *Piper*. (1) eupomatenóide-3, (2) eupomatenóide-5, (3) eupomatenóide-6, (4) conocarpano, (5) “piperkadsin C”, (6) futoquinol.

Outras classes de substâncias sintetizadas por espécies de *Piper* apresentam atividade antifúngica, como amidas de *Piper arboreum*, *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*, são ativas contra espécies de *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (ALÉCIO et al., 1998; VASQUES DA SILVA et al., 2002). Substâncias derivadas do ácido benzóico de *Piper lanceaefolium*, como ácido

metil-éster lanceaefólico (Fig. 4, 1) inibiu o crescimento na concentração de 100 µg/ml de *C. albicans* (LÓPEZ et al., 2002). Cromonas preniladas como metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato (Fig. 4, 2) e metil-2,2-dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxilato (Fig. 4, 3) são compostos antifúngicos presentes nas folhas de *Piper aduncum* (MORANDIM et al., 2005).

Piper abutiloides, conhecida popularmente como “caapeba de Santa Catarina” é usada com propriedades analgésicas. A partir de suas folhas foram obtidos o extrato bruto 80% em solução hidroetanólica e frações hexânica, diclorometânica e aquosa. O extrato bruto foi mais ativo contra *Candida tropicalis* a concentração de 30 µg/ml, a fração hexânica foi a mais ativa, contra *Candida glabrata*, com MIC de 7,8 µg/ml (JOHAN et al., 2008).

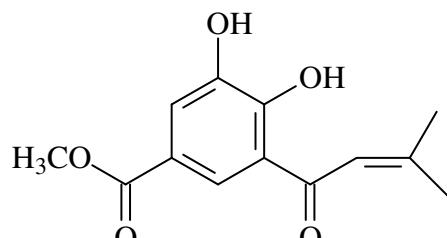
Piper betle usada tradicionalmente na Tailândia e em países tropicais, no tratamento de doenças de pele, ocular, urticária, oclusão dos brônquios, na prevenção bucal e dermatológica. Trakranrungsie et al. (2008), analisaram extratos das folhas de *P. betle*, rizomas de *Alpinia galanga* Willd. e bulbos de *Allium ascalonicum* L. O extrato de *P. betle* e *A. ascalonicum* apresentaram melhores resultados contra *T. mentagrophytes* com IC90 de 230,4 e 204,85 µg/ml, respectivamente, enquanto *A. galanga* foi mais ativa contra *M. canis.*, com valor de 106,68 µg/ml.

Svetaz et al. (2010) analisaram a atividade antifúngica de diversas famílias de plantas, inclusive a *Piperaceae*, entre as quais foram ativas contra dermatófitos e apresentaram MIC de 125 µg/ml. Entre elas encontram-se *Piper amalgo* L., *Piper glabratum* Kunth., *Piper jacquemontiamum* Kunth., *Piper scabrum* Lam.

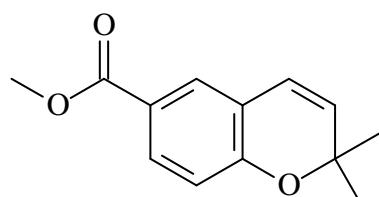
A piperovatina (Fig. 4, 4), uma isobutilamida isolada de *Piper psicotorum*, aumenta a descarga de cálcio intracelular através da despolarização de canais de

sódio (McFERREN et al., 2002). Outra espécie originada da Tailândia é a *Piper sarmentosum*, cujas substâncias isoladas pelitorina (Fig. 4, 5) e 1-(3,4-metilenodioxifenil)-1E-tetradeceno (Fig. 4, 6) tem ação contra *Mycobacterium tuberculosis*, porém são inativas contra *Plasmodium falciparum* (RUKACHAISIRIKUL et al., 2004). *P. betle* possui atividade antidiabética (ARAMBEWELA et al., 2005). RODRIGUES et al. (2009) isolaram três alcalóides de *Piper tuberculatum*, dihidro-piplartina (Fig. 4, 7), piplartina (Fig. 4, 8) e ácido 3,4,5-trimetóxidihidrocinâmico (Fig. 4, 9), e apresentaram atividade antinociceptiva visceral induzida por ácido acético.

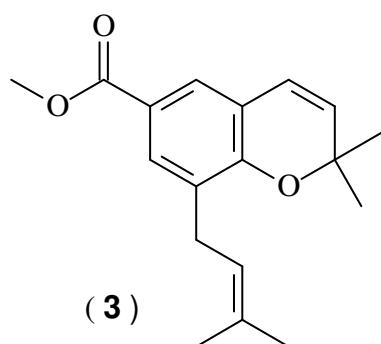
Além dos extratos e substâncias isoladas da família *Piperaceae*, formulações tópicas também são desenvolvidas a partir das plantas dessa família. Como exemplo, *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Röpke et al. (2002) incorporaram o extrato da raiz dessa planta em um gel hidrofílico, e foram desenvolvidas outras três formulações contendo 4-nerolidilcatecol (Fig. 4, 10), gel hidrofílico, gel-creme e emulsão O/A. Com base na atividade oxidante comprovada anteriormente, foi analisado a permeação cutânea das formulações, as quais tiveram ótima permeabilidade. Devido à atividade antifúngica de *P. betle*, Trakranrungsie et al. (2008) desenvolveram uma formulação contendo extrato dessa espécie. O extrato foi incorporado em creme à concentração de 10% e mostrou-se bem efetiva em testes *in vitro*.



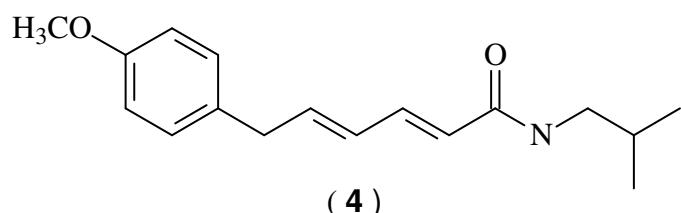
(1)



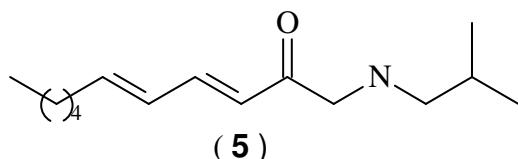
(2)



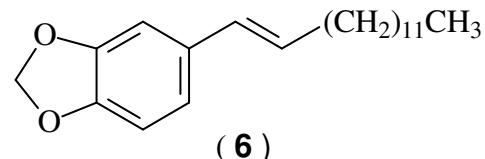
(3)



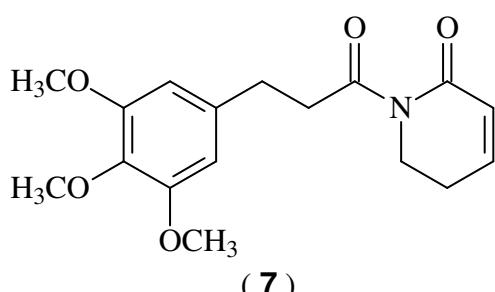
(4)



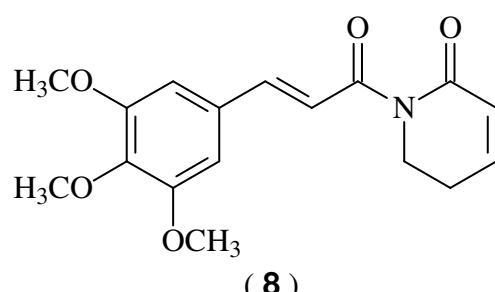
(5)



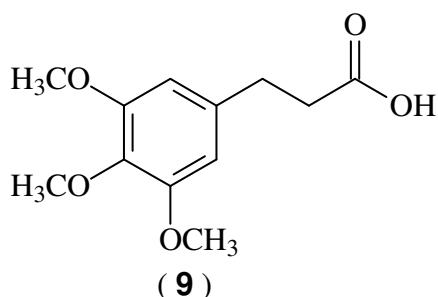
(6)



(7)



(8)



(9)

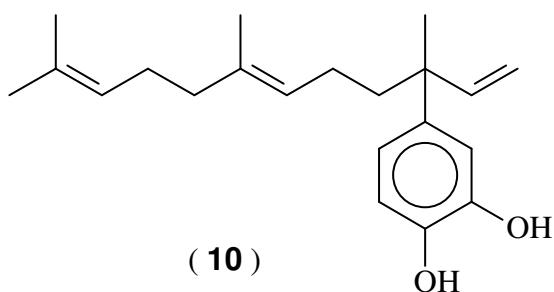


Figura 4 Classes de substâncias isoladas de *Piper* sp. (1) metil-éster lanceaefólico, (2) metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato, (3) metil-2,2-dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxilato, (4) piperovatina, (5) pelitorina, (6) 1-(3,4-methylenodioxifenil)-1E-tetradeceno, (7) dihidro-piplartina, (8) piplartina, (9) ácido 3,4,5-trimetóxidihidrocinâmico, (10) 4-nerolidilcatecol.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar formulações tópicas antifúngicas para o tratamento de dermatomicoses contendo extrato e fração das folhas de *Piper regnellii*.

Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a atividade das substâncias isoladas de *Piper regnellii* contra dermatófitos
- ✓ Verificar a atividade antifúngica em possíveis alvos, como na ligação com esterol de membrana e na fase do crescimento fúngico
- ✓ Produzir duas formulações tópicas antifúngicas
- ✓ Determinar a atividade *in vitro* do esmalte contendo fração hexano
- ✓ Avaliar a permeação das formulações em epiderme e unha por espectroscopia de fotoacústica
- ✓ Estudo toxicológico em animais, de uma emulsão contendo extrato da planta, incluindo análise bioquímica, hematológica sanguínea e histológica de órgãos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, p. 637 – 639, 1998.
- ARAMBEWELA, L. S. R.; ARAWAWALA, L. D. A.M.; RATNASOORIYA, W. D. Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of *Piper betle* leaves in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 102, p. 239 – 245, 2005.
- BARRET, David. From natural products to clinically useful antifungals. **Bioquímica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1587, p. 224 – 233, 2002.
- BLANCO, M. F.; MAZZINI, M. A. **Clínica Dermatológica e Sifilográfica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1948, 732 p.
- BOHN, M.; KRAEMER, K. T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.43, n. 4, oct., p. S57 – S-69, 2000.
- BUHSE, L.; KOLINSKI, R.; WESTENBERGER, B.; WOKOVICH, A.; SPENCER, J.; CHEN, C. W.; TURUJMAN, S.; GAUTAM-BASAK, M.; KANG, G. J.; KIBBE, A.; HEINTZELMAN, B.; WOLFGANG, E. Topical drug classification. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 295, p. 101 – 112, 2005.
- CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Disease**, New York, v. 2, sept., p. 550 – 563, 2002.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 1231.
- CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR., A. M.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 111, p. 409 – 412, 2007.
- DAVIES, K. J. Study to determine the efficacy of clotrimazole 1% cream for the treatment of onychomycosis in association with the mechanical reduction of the nail plate. **The Foot**, Paris, v. 16, p. 19 – 22, 2006.

DEMAIN, A. L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 29, n. 6, p. 821 – 842, 2009.

EFFENDY, I. Therapeutic stragies in onychomycosis. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 4, suppl. 4, S3 – S10, 1995.

ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. The influence of surface carbohydrates in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 155, p. 144 – 153, 2004.

ESTEVES, J. A.; CABRITA, J. D.; NOBRE, G. N. **Micologia Médica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990, 1058 p.

FANG, J; LEU, Y.; WANG, Y.; TSAI, Y. In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamid hydrogels using Wistar rat as an animal model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 15, p. 417 – 423, 2002.

FARRAR, M. D.; INGHAM, E. Acne: Inflammation. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 22, n. 380, p. 380 – 384, 2004.

FOSTER, K. W.; FRIEDLANDER, S. F.; PANZER, H.; GHANNOUN, M.; ELEWSKI, B. E. A randomized controlled trial assessing the efficacy of fluconazole in the treatment of pediatric tinea capitis. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 53, n. 5, p. 798-809, 2005.

FREIXA, B.; VILA, R.; VARGAS, L.; LOZANO, N.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, p. 427 – 430, 1998.

FREIXA, B.; VILA, R.; FERRO, E. A.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL. Antifungal principles from *Piper fulvescens*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, p. 873 – 875, 2001.

GARG, S.; NAIDU, J.; SINGH, S. M.; NAWANGE, S. R.; JHARIA, N.; SAXENA, M. In vitro activity of terbinafine against Indian clinical isolates of *Candida albicans* and non-albicans using a macrodilution method. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 16, p. 119 – 125, 2006.

GENESER, F. **Histologia com bases biomoleculares**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A, 2003, 616 p.

GHAHFAROKHI, M. S.; GOODARZI, M.; ABYANEH, M. R.; AL-TIRAIHI, T.; SEYEDIPOUR, G. Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, Milano, v. 75, p. 645 – 655, 2004.

GUPTA, A.; FLECKMAN, P.; BARAN, R. Ciclopirox nail lacquer topical solutions 8% in the treatment of toenail onychomycosis. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 43, n. 4, p. S70 – S80, oct., 2000.

HARRIS, Rhiannon. Progress with superficial mycoses using essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**, Missouri, v. 12, n. 2, p. 83 – 91, 2002.

HECTOR, R. F. An overview of antifungal drugs and their use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, p. 240 – 249, 2005.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, oct., 2002.

HUSSAIN, A. A.; ASHOUR, S. M.; EL-MOKADEM, M. R. Antifungal activity of Egyptian essential oils against some dermatophytes. **African Journal of Mycology and Biotechnology**, Cabo, v. 11, p. 1-20, 2003.

ISHIDA, K. MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 58, p. 942 – 949, 2006.

JOHAN, S.; COTA, B. B.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; PIZZOLATTI, M. G.; RESENDE, M. A.; ZANI, C. L. Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* Kunth. **Mycoses**, Berlin, v. 52, p. 499 – 506, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2008, 524 p.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 79, n. 4, p. 529 – 538, 2007.

KAZEMI, A. *Tinea unguium* in the North-West of Iran (1996-2004). **Revista iberoamericana de micología**, Barcelona, v. 24, p. 113 – 117, 2007.

KIM, K. H; CHOI, J. W.; HA, S. K.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Neolignans from *Piper kadsura* and their anti-neuroinflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 20, p. 409 – 412, 2010.

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C; HEINS-VACCARI; MELO, N. T. **Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2009, 1104 p.

LOPES, P. R. S.; RADÜNS NETO, J.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 40, n. 10, p. 1029 – 1034, out., 2005.

LÓPEZ, A.; MING, D. S. M.; TOWERS, G. H. N. Antifungal activity of benzoic acid derivates from *Piper lanceaefolium*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, p. 62 – 64, 2002.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regmellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, p. 2126 – 2130, 2006.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, New York, v. 23, n. 6, p. 1207-1220, 1984.

McFERREN, M. A.; CORDOVA, D.; RODRIGUEZ, E.; RAUH, J. J. In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, and isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 83, p. 201 – 207, 2002.

MARQUELE, F. D.; DI MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 39, p. 455 – 464, 2005.

MARTY, J. P. L. Amorolfine nail lacquer: a novel formulation. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 4, sup. 1, p. S17 – S21, 1995.

MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 16, p. 282 – 286, 2005.

MORTEZA-SEMNANI, K.; SAEEDI, M.; HAMIDIAN, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Glaucium grandiflorum*. **Fitoterapia**, Milano, v. 75, p. 123 – 129, 2004.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 236, p. 1 – 26, 2002.

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

NUGLISCH, L. E. R.; DIAS, D. T.; SEHN, E.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; SANTOS, S. T. S.; FUSHIMI, M. Y. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail. **Journal de Physique IV**, Les Ulis, v. 125, p. 631 – 633, 2005.

ODDS, F. C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **The Mycologist**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 51 – 55, may, 2003a.

ODDS, F. C. Antifungal agents: mechanisms of action. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272 – 279, jun., 2003b.

ORDOÑEZ, A. A. L.; ORDOÑEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I. Design and quality control f a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 378, p. 51 – 58, 2009.

OSBORNE, C. S.; LEITNER, I.; FAVRE, B.; RYDER, N. S. Antifungal drug response in an in vitro model of dermatophyte nail infection. **Medical Mycology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 159-163, 2004.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpinol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, p. 290 – 296, 2009.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, New York, v. 46, n. 4, p. 597 – 673, 1997.

PERSHING, L. K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, G. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 38, n. 1, jan., p. 90 – 95, 1994.

PESSINI, G. L. **Estudo fitoquímico, botânico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae)**. 2003. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003a.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115 – 1120, dec., 2003b.

PIÈRARD, G. E.; ARRESE, J. E.; De DONCKER, P. Antifungal activity of itraconazole and terbinafine in human stratum corneum: a comparative study. **Journal of the American Academy of the Dermatology**, St. Louis, v. 32, n. 3, p. 429 – 435, 1995.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; FERRO, E.; PARELLA, T.; CASANOVA, J.; SAÑIGUERAL, S. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, p. 49 – 52, 2005.

REBOLLO, N.; LÓPEZ-BARCENAS, A. P.; ARENAS, R. Tinea capitis. **Actas dermo-sifiliográficas**, Madrid, v. 99, p. 91 – 100, 2008.

REPKA, M. A.; MIDIDODDI, P. K.; STODGHILL, S. P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 282, p. 95-106, 2004.

RINCÓN, S.; CELIS, A.; SOPÓ, L.; MOTTA, A.; GARCÍA, M. C. P. *Malassezia* yeasts species isolated from patients with dermatologic lesions. **Biomédica**, Bogotá, v. 25, p. 189 – 195, 2005.

RODRIGUES, R. V.; LANZNASTER, D.; BALBINOT, D. T. L.; GADOTTI, V. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 32, n. 10, p. 1809 – 1912, 2009.

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Fundamentos dos testes de segurança de produtos cosméticos, **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.9, p. 55 – 59, sept./oct., 1997.

RÖPKE, C. D.; KANEKO, T. M.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, V. V.; BARROS, S.; SAWADA, T. C. H.; KATO, M. J.; BARROS, B. M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcathecol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Tokyo, v. 249, p. 109 – 116, 2002.

RUKACHAISIRIKUL, T.; SIRIWATTANAKIT, P.; SUKCHAROENPHOL, K.; WONGVEIN, C.; RUTTANAWEANG, P.; WONGWATTANAVUCH, P.; SUKSAMRARN, A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 93, p. 173 – 176, 2004.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTEERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MELFOR, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 122, p. 523 – 532, 2009.

SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S. L.; GONÇALVES, C. C. M.; BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee própolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 635, 115 – 120, 2009.

SILVA, F. M.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, Berlin, v. 52, p. 511 – 517, 2009.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, p. 521 – 527, 2002.

STÖHR, J. R.; XIAO, P; BAUER, R. Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 75, p. 133 – 139, 2001.

STRATEN, M. R. V.; HOSSAIN, M. A.; GHANNOUM, M. A. Cutaneous infections dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 17, p. 87 – 112, 2003.

SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G.; CÁCERES, A.; CECHINEL FILHO, V.; GIMÉNEZ, A.; PINZÓN, R.; ZACCHINO, S. A.; GUPTA, M. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, p. 137 – 158, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004, 920 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 760 p.

TRAKRANRUNGSIE, N.; CHATCHAWANCHONTEERA, A.; KHUNKITTI, W. Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of *Piper betle*, *Alpinia galanga* and *Allium ascalonicum* extracts *in vitro*. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 84, p. 80 – 84, 2008.

TRUISTE, C. V. R.; PHILIPPSEN, G. S. UEDA-NAKAMURA, T.; NATALI, M. R. M.; DIAS FILHO, B. P.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; NAKAMURA, C. V. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 83, 1529 – 1536, 2007.

VASQUES DA SILVA, R. NAVICKIENE, D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, p. 521 – 527, 2002.

VENDRAMETTO, M. C.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of

eupomathenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallidescens*. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 59, p. 154 – 158, 2010.

WALSH, T.J., GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.10, p. 48 – 66, 2004.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Research**, Washington, v. 8, n. 3, p. 317 – 335, jul., 1995.

WEBSTER, G. F. Topical medications: a focus on antifungals and topical steroids. **Office Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 33 – 38, 2001.

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

WIART, C.; HANNAH, N. A.; YASSIM, M.; HAMIMAH, H. SULAIMAN, M. Antimicrobial activity of Tiger's Betel (*Piper porphyrophyllum* N.E. Br., Piperaceae). **Phytotherapy Research**, London, v. 18, p. 783 – 784, 2004.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001, p. 523.

ZAUG, M. Amorolfine nail lacquer: clinical experience in onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 4, sup. 1, p. S23 – S30, 1995.

ZHANG, A. Y.; CAMP, W. L.; ELEWSKI, B. E. Advances in topical and systemic antifungals. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 25, p. 165 – 183, 2007.

Article

4. Antifungal Activity and Nail Permeation of Nail Lacquer Containing *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae) Leave Extracts and Derivatives

Andrea Mayumi Koroishi ¹, Elizandra Sehn ², Mauro Luciano Baesso ², Tânia Ueda-Nakamura ^{1,3}, Celso Vataru Nakamura ^{1,3}, Diógenes Aparício Garcia Cortez ^{1,4} and Benedito Prado Dias Filho ^{1,3*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Brazil; E-Mail: mayumikoroishi@gmail.com (A.M.K.); tunakamura@uem.br (T.U.N.); cvnakamura@uem.br (C.V.N); dagcortez@uem.br (D.A.G.C.)

² Pós-graduação em Física, Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Brazil;
E-Mails: elizandrsehn@hotmail.com (E.S.); mlbaesso@uem.br (M.L.B.)

³ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Brazil

⁴ Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed: bpdfilho@uem.br; Tel.: +55 44 30114135; Fax: +55 44 30114109.

Received: 31 March 2010; in revised form: 11 May 2010 / Accepted: 12 May 2010 /

Published: 1 June 2010

Abstract: The dermatophytes are filamentous fungi that cause cutaneous fungal infections because they use keratin as a nutrient source. For this study the antidermatophyte activity of the extracts and derivates from leaves of *Piper regnellii* was analyzed. From the dichloromethane extract (EBD) neolignans such

as eupomatenoid-3 and eupomatenoid-5 were obtained, and it was submitted to fractionation to remove the green residue, designated as the chloroform fraction (FF). Extracts, chloroform fraction and compounds were tested against *Trichophyton rubrum* ATCC 28189 to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The chloroform fraction was incorporated to nail lacquer that was analyzed by photoacoustic spectroscopy, *in vitro* assay and scanning electronic microscopy. For antifungal activity in solid medium the dichloromethane extract and chloroform fraction were used. The compounds eupomatenoid-3 and eupomatenoid-5 were less active than the dichloromethane extract against *T. rubrum*. EBD and FF showed moderate activity in hyphal growth inhibition in solid medium and EBD did not link to ergosterol. Nail lacquer containing the chloroform fraction showed good penetration through the nail as determined by photoacoustic spectroscopy. From *in vitro* studies it was observed that nail lacquer concentrations above 20 mg/mL prevented the growth of fungi, but concentrations up to 2.5 inhibited the growth. Scanning electronic microscopy was used to confirm the *in vitro* nail lacquer activity results. The specie *P. regnellii* showed great antifungal activity against *T. rubrum*, and nail lacquer containing its chloroform fraction has great potential to treat onychomycosis caused by these microorganisms.

Keywords: *Piper regnellii*; nail lacquer; dermatophyte; *Trichophyton rubrum*; onychomycosis

1. Introduction

In tropical and subtropical countries, fungal infections are one of the most common skin diseases. Among them, in Brazil, one of the main superficial fungal infections are dermatophytoses. Among the fungal agents responsible for this are the dermatophytes which infect keratinized structures, including nails, hair and skin because they can use the keratin as nutrient source. The genera causing these infections are *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton* [1]. In the last 30 years, there has been has increased concern about fungal infections due to the increasing the number of immuno-compromised patients and individuals who receive chemotherapy treatment like cancer patients and transplant recipients, treated with immunosuppressive drugs [2]. There is a major concern with the effectiveness of antifungals, due to their limitations and also the toxicity of the same, which can lead to the non-recurrence of the fungistatic effect or lead to resistance over the treatment period [3]. Because of this recently chemical and pharmacological studies on substances derived from plants with therapeutic properties are increasingly taking place.

The family *Piperaceae*, consisting of the genera *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia* and *Pothomorphe*, has medicinal properties widely employed by the population [4]. Regarding the genus *Piper*, phytochemical searches worldwide have isolated many classes of bioactive

compounds like alkaloids, amides, propenylphenols, lignans, neolignans, terpens, chalcones, flavones and many others [5]. This genus displays a variety of biological activities, for example the antifungal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* against *Cladosporium cladosporioides* [6], *Piper fulvescens* against *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* [7,8], moreover, the specie *Piper regnellii* showed activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, yeasts *Candida krusei* and *Candida albicans* [9], dermatophyte *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* [10], protozoa like *Leishmania amazonensis* [11] and *Trypanosoma cruzi* [12].

The human nail is composed by highly compressed and keratinized dead cells. Many nail disorders may occur such as dystrophy, hypertrophy, inflammation, infection, etc [13]. Onychomycosis is a type of ungual disorder. The main fungi that cause this pathology are *Epidermophyton floccosum*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* [14].

Oral therapy displays some disadvantages such as systemic adverse effects and drug interactions. To work around this, topical therapy is advantageous because the drug acts directly at the site of action and this possibly reduces the side effects, drug interactions and costs of treatment [15]. The use of nail lacquer formulations containing an antimycotic may act as a regular transungual delivery system thereby facilitating the penetration of the active principles into the nail [15,16].

The aim of this study was to determine the antifungal activity against *T. rubrum* of extract, fractions and compounds from leaves of *P. regnellii*. In addition, a nail lacquer containing the chloroform fraction to treat onychomycosis was developed and the activity of this formulation was analyzed by photoacoustic spectroscopy, *in vitro* assay and scanning electronic microscopy.

2. Results and Discussion

A 9:1 hydroethanolic extract, a dichloromethane extract (EBD) and an aqueous extract were obtained from the leaves of plant *P. regnellii*. The EBD was clarified using chloroform as mobile phase, and then called the chloroform fraction (FF). In addition, compounds as eupomatenoid-3 and eupomatenoid-5 were isolated from the EBD. All the extracts and derivates were submitted to the antifungal activity assay.

The minimal inhibitory concentration of the extract was 15.6 µg/mL, as described by Koroishi *et al.* [10] and that of the chloroform fraction was 7.8 µg/mL. The two isolated neolignans, eupomatenoid-3 and eupomatenoid-5 showed activity greater than 100 µg/mL and 25 µg/mL, respectively. Nystatin, ketoconazole, fluconazole and amphotericin B were used as standard drugs, and their MIC values were 0.78, 0.39, 3.2 and 0.39 µg/mL, respectively (Table 1). The minimal concentration values required for inhibition of spore germination are also presented in Table 1. The results were satisfactory. The MIC values of the extract and fractions were not significantly different, showing that even after removal of the dark green residue using chloroform in the clarification process the activity is retained. In previous studies different hydroethanolic extracts of the same plant were tested against yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes, and the microorganisms most sensitive to the extracts were dermatophytes, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* and *M. gypseum* [10]. Other *Piper* species contain compounds with antifungal activity, such as the amides of *Piper*

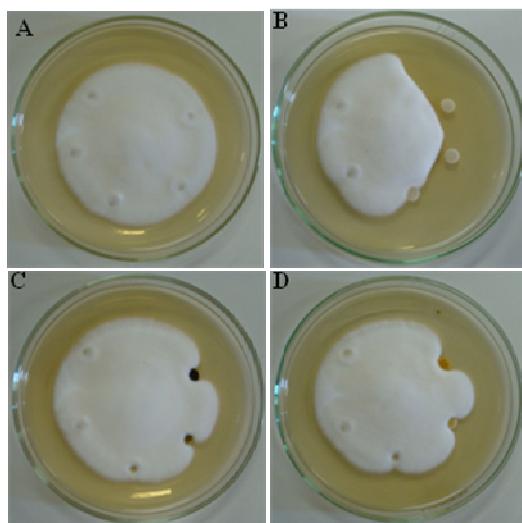
arboreum and *Piper tuberculatum*, active against *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides*, respectively [6]. Danelutte [17] examined the activity of flavonones and prenylated hydroquinones of *Piper crassinervium* against the same fungi, which varied between 1 and 5, and 1 to 10 µg/mL, Freixa *et al* [8] studied the activity of three neolignans of *Piper fulvescens*, eupomatenoid-5, eupomatenoid-6 and conocarpan, and only the first one was not active against the dermatophyte *T. mentagrophytes*, while the other compounds showed activity at 1 and 8 µg/mL, respectively. Many other species have been studied for antidermatophyte activity, like species of the family Asteraceae. For example, the chloroform extract of *Pteroaulon polystachyum* showed better activity at a concentration of 12.5 µg/mL against *T. mentagrophytes* [2]. Prasad *et al.* [18] checked the activity of 4'-methoxyflavone, a compound isolated of *Psoralea coryfolia* (Fabaceae), with a MIC value of 62.5 µg/mL vs. *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* and 125 µg/mL against *E. floccosum* and *M. gypseum*. Among other species *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) and *Caesalpinia pyramidalis* Tul are active against *Candida guilliermondii* and *T. rubrum* with MIC values between 6.25 and 25 µg/mL. In previous studies it was verified that the extracts obtained of leaves from *P. regnellii* significantly inhibited the germination of *T. rubrum* spores at concentration of 7.8.

Table 1. Antifungal activity of extract, fraction and isolated compounds of leaves from *P. regnellii* against *T. rubrum*.

	Antifungal Activity	
	Minimal concentration required for inhibition of spore germination (µg/mL)	Minimal inhibitory concentration (µg/mL)
Dichloromethane extract (EBD)	7.8	15.6
Chloroform fraction (FF)	7.8	7.8
Eupomatenoid-3	>100	>100
Eupomatenoid-5	12.5	25
Amphotericin B	0.2	0.4
Nystatin	0.4	0.8
Fluconazole	1.6	3.2
Ketoconazole	0.2	0.4

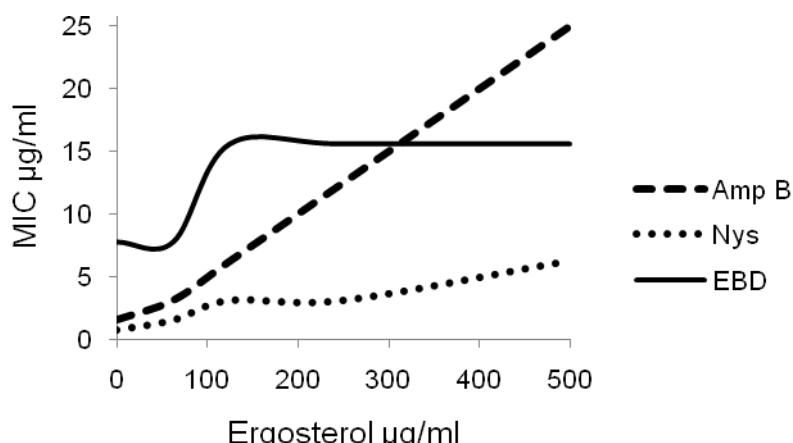
There are two phases of fungal growth, spore germination and hyphal growth, where drug action can occur. The hyphal growth inhibition was analyzed and the extract and fraction showed moderate inhibition at a concentration of 100 µg/mL, while amphotericin B inhibited it at 10 µg/mL, as observed in the Figure 1. DMSO and water were employed as controls.

Figure 1. Antifungal active in solid medium against *T. rubrum*. A= Negative control – DMSO 100, 10, 1, 0.1%; B= Amphotericin B – 100, 10, 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and water. C= Dichloromethane extract (EBD) and D= Chloroform fraction (FF) – 1000, 100, 10 and 1 $\mu\text{g/mL}$. The water was used as control, and the concentrations decrease in clockwise fashion.



Many different modes of action can be studied, for example, the biosynthesis of ergosterol or the interference of drug-ergosterol binding with cell functions. Ergosterol is lipid that forms part of the membranes of fungi and protozoa. For example amphotericin B binds to ergosterol perturbing membrane functions and causing leakage of cell contents [19]. Figure 2 shows the effect of exogenous ergosterol on the MIC of the drugs.

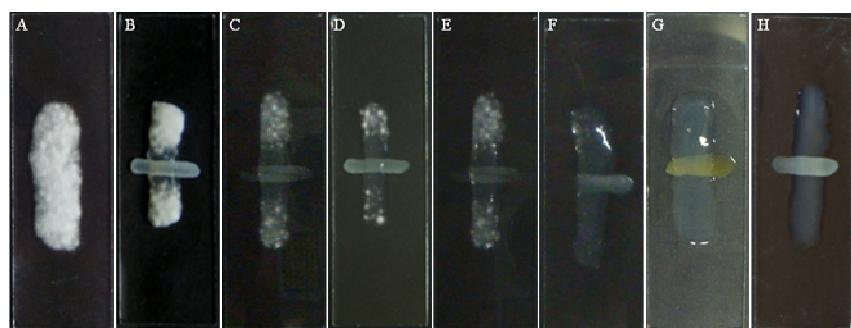
Figure 2. Ergosterol effect assay in *T. rubrum* – Exogen ergosterol (62.5 – 500 $\mu\text{g/mL}$) was added on the MIC of the dichlomethane extract (EBD), amphotericin B (Amp B) and nystatin (Nys).



When the concentrations of ergosterol increase the values of the MIC of amphotericin B also increase. In the absence of ergosterol the MIC of this drug was 1.56 $\mu\text{g/mL}$, and by

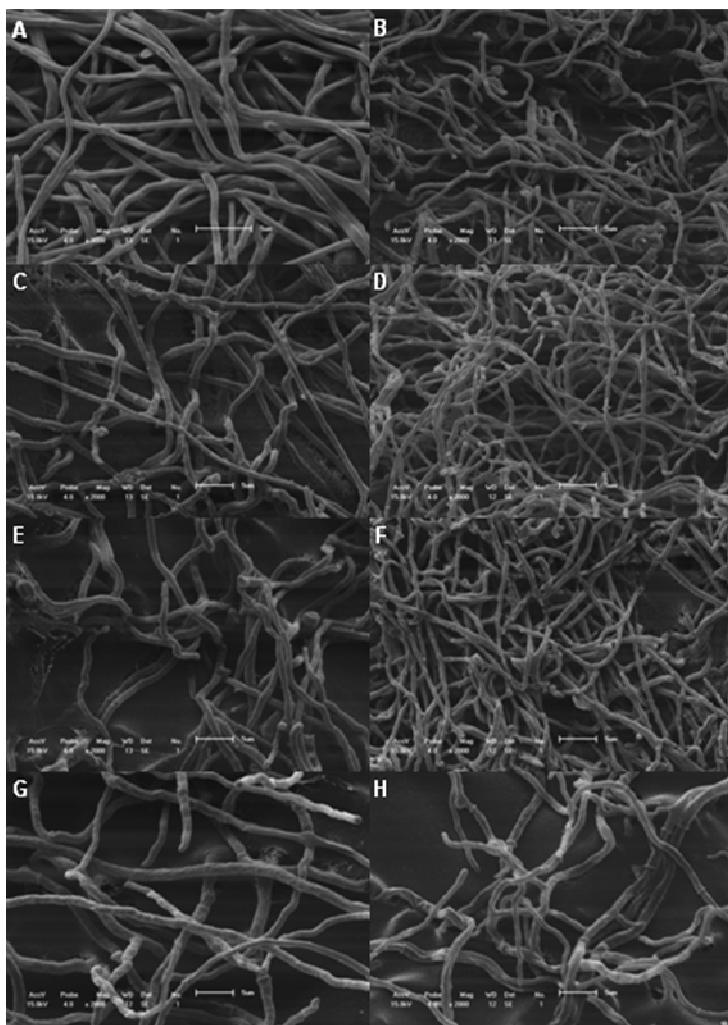
varying the substrate between 0 to 500 $\mu\text{g/mL}$, the MIC changed from 1.56 to 25 $\mu\text{g/mL}$, indicating binding with the ergosterol. Despite this, the extract and nystatin did not have the same activity as amphotericin B, because when the ergosterol concentration increased the MIC values remained the same.

Figure 3. Antifungal activity of nail lacquer with different concentrations of extract against *T. rubrum*. A= Control; B= Nail lacquer without fraction; Nail lacquer with fraction: C=2.5 mg/mL; D= 5 mg/mL; E= 10 mg/mL; F= 20 mg/mL; G= 40 mg/mL; H= Micolamin.



The chloroform fraction was incorporated into nail lacquer at various concentrations ranging between 0.3 to 40 mg per mL. The concentration of 20 mg/mL did not present visible growth compared the control (Figures 3F and 3A). However, concentrations above 2.5 mg/mL inhibited the growth of fungi (Figure 3C) at the point of application of the nail lacquer. Figure 4 shows images of MEV of *T. rubrum*. As previously mentioned, in this method was possible to confirm the reduction of the growth of cultures treated with nail lacquer containing chloroform fraction. There is a reduced growth of cells treated near the nail lacquer (Figures 4C, 4E and 4G). Comparing the figures 4D, 4F and 4H could see cell growth was lower at a concentration of 5 mg/mL. It is possible the active compounds spread by the agar and in higher concentrations the compounds inhibited the growth.

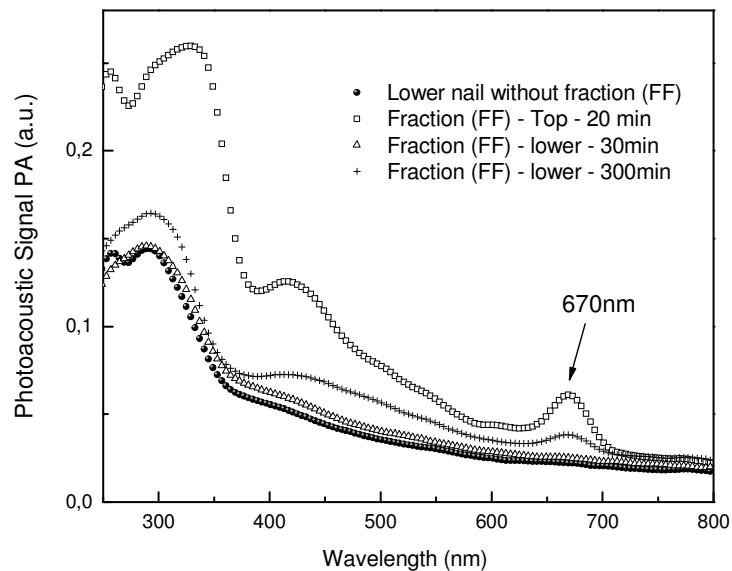
Figure 4. Scanning electronic microscopy of *Trichophyton rubrum* treated with different concentrations of fraction in nail laquer. A and B = control; C and D= nail lacquer without fraction; E and F= nail lacquer with 1.25 mg of chloroform fraction; G and H= nail lacquer with 5 mg of chloroform fraction. C, E and G= samples taken near the nail lacquer; D, F and H=samples taken far the nail lacquer. Magnification: 3000 \times (A) and 2000 \times (B – H). Bars 5 μ m.



The human nail is susceptible to a large number of fungal (onychomycosis) and other infections [21]. The photoacoustic spectroscopy technique if used to measure the thermal diffusivity (d) of human nails [21]. Figure 5 shows the spectra of the drugs on the nail. The medicine was placed on top of the nail and a top spectrum was obtained soon after. The graphic shows the curve of the absorption spectrum of the bottom of the nail 30 min after application of FF fraction. After 5 h of application of the product, could be performing the spectrum observed in the inner part of the permeation of the nail. The band around 670 nm becomes visible, showing the permeation. The nail lacquer containing the FF fraction showed good penetration in the nail and the absorption is still equal after extending the time. Nuglisch *et al* [22] verified that using two formulations contained cyclopirox the propagation rate through the nails in different samples from healthy volunteers showed that the photoacoustic

spectroscopy technique is a useful tool to analyze the penetration of topical formulations in human nails.

Figure 5. Photoacoustic Spectroscopy Measurement. After 20 min the FF fraction was detected at 670 nm. Spectra obtained with excitation performed in the nail. The light modulation frequency was 20 Hz. The inset highlights the presence of the FF fraction absorption in the spectrum. With this procedure the penetration depth in the nail (the thermal diffusion length) corresponds to about 670 nm.



3. Experimental

3.1. Plant material

The leaves from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallidescens* (C. DC.) Yunck (*Piperaceae*) were collected in April 2006 in Horto of Medicinal Plants “Profª. Irenice Silva” on the Campus of Universidade Estadual de Maringá. The plant material was identified by Marilia Borgo of the Botanical Department of Universidade Federal do Paraná, and a voucher specimen (HUM 8392) is deposited at the Herbarium of Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil.

3.2. Preparation of plant extract and fractions

Dried and powdered plant material (leaves) was extracted by maceration with 9:1 ethanol-water at room temperature at a leaves:solvent ratio of 1:10 (w/v). After the extract was filtered and the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure at 40 °C to give an aqueous

extract and a dark green residue which was washed with dichloromethane and the organic solvent removed to give the dichloromethane extract that was submitted to two processes. First, to isolate the compounds eupomatenoid-3 and eupomatenoid-5 the techniques already described in previous studies [10,12,20] were used. The extract was submitted to vacuum chromatography on silica gel eluted with solvents of increasing polarity. The hexane fraction, obtained by this process, was rechromatographed by column chromatography on silica gel 60 (70–230 mesh) eluted with hexane and hexane-chloroform in the following proportions: 49:1, 19:1, 9:1 and 1:1, v/v, chloroform, ethyl acetate, acetone and methanol. The second process, to remove (clarify) the green residue was used *D*-chloroform column eluted with chloroform, obtaining the chloroform fraction.

3.3. Nail lacquer formulation

The formulation used consisted of a solvent volatile (ethanol, ethyl acetate, methanol), apolar soluble polymer (methacrylic acid copolymer, vinyl polymers), plasticizer (triacetine, dibutyl vitalato) and the chloroform fraction, at concentrations between 0.6 to 40 mg/mL.

3.4. Microorganism used and growth conditions

The test species used for this investigation was *T. rubrum* ATCC 28189. The fungi was maintained on Sabouraud dextrose agar (SDA) slants at 28 °C and subcultured monthly throughout this study.

3.5. Antifungal activity assay

3.5.1. Microbroth dilution assay

Culture was grown on Sabouraud dextrose agar (SDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) tubes for 7–14 days, after which time spores were harvested from sporulating colonies and suspended in sterile ion solution. The concentration of spores was adjusted to 1.0×10^5 spores/mL using a hemocytometer. The antifungal assay was performed by the microdilution technique in sterile flat bottom microplates. Each well contained appropriate test samples, Sabouraud dextrose broth and approximately 2×10^3 – 3×10^3 spores in a total volume of 100 µL. The plates were incubated at 28 °C for 72 h. Two susceptibility endpoints were recorded for each isolate. The MIC was defined as the lowest concentration of compounds at which the microorganism tested did not demonstrate visible growth. For this experiment the

dichloromethane extract, the chloroform fraction, the isolated compounds and nystatin, amphotericin, fluconazole and ketoconazole at concentrations between 0.2 to 100 µg/mL as standard drugs were used. For comparative purposes, the plates were incubated at 28 °C for 20–30 h and then examined for spore germination under an inverted microscope. For quantification, spores were considered germinated if they had a germ tube at least twice the length of the spore.

3.5.2. Antifungal activity in solid medium

Petri-plates containing 20 mL de SDA medium were seeded with 10 µL of standard spore suspension (10^5 spores/mL). The plates were incubated in a humidified chamber at a temperature of 28 °C until the diameter growth mycelial growth 2–3 cm. After, the disks were placed at a distance of 0.5 cm from the edge of the colony. About 10 µL of serial dilutions of dichloromethane extract, chloroform fraction, DMSO, and water were added to the disks. The plates were incubated at a temperature of 28 °C until final growth. The inhibition of hyphal elongation was observed by the lack of growth around the disk containing the drug test [18].

3.5.3. Ergosterol Effect Assay

For this assay, the ergosterol was added the Sabouraud dextrose broth medium at four concentrations: 500, 250, 125 and 62.5 µg/mL. The dichloromethane extract was transferred to the first well, a two fold serial dilution was performed and the medium was incubated at 28 °C for 72 h. Amphotericin B and nystatin were used as controls [3].

3.5.4. *In vitro* test with the nail lacquer containing fraction

In this test, the nail lacquer was applied at glass slides forming a line. Concentrations between 0.3 to 40 mg/mL were analyzed, and Micolamin was used as control drug. The inoculum used had 3×10^4 spores/mL. The microculture was placed in a Petri dish in a moist chamber at a temperature of 28 °C for 5 days. Later, the cultures underwent scanning electronic microscopy. Three portions were removed, far, near and upon the application point.

3.5.5. Scanning electronic microscopy

The microculture was fixed in glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M cacodilato buffer for 1 day. Later, it was washed in 0.1 M cacodilato buffer. The samples were placed on a specimen

support with poly-L-lysine. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, 15–100% for 15 min each. Then, they were submitted to critical-point-drying in CO₂, coated with chromium in a Penning sputter system in a high-vaccum chamber (Gatan-Model 681), coated with gold and observed with a Shimadzu SS-550 Scanning electron microscope field-emission scanning electron microscope.

3.6. Photoacoustic Spectroscopy Measurements

The photoacoustic spectroscopy (PAS) measurements were performed using an experimental setup as shown in Figure 5. The monochromatic light was obtained from a 1000 W xenon arc lamp (Oriel Corporation 68820). The monochromator used was also from Oriel Instruments (model 77250). The light beam was modulated with a mechanical chopper (Stanford Research Systems SR540). The photoacoustic cell was homemade projected to have a minimal volume. It was made of aluminum block, machined to hold samples with maximum dimensions of about 5 mm in diameter and 1 mm thick, which allows light to enter through a high transparent quartz window of 6 mm in diameter and 2 mm thick. The micro-phone chamber was 15 mm away and connected to the sample holder chamber by means of a 1 mm diameter duct. The used capacitive microphone is a very sensitive 12 mm diameter Brüel & Kjaer model 2639, which presents a high gain of 50 mV/Pa and flat frequency response performance from 1 Hz to 10 kHz. The lock-in amplifier was from EG & G Instruments, model 5110. All the photoacoustic spectra were obtained at a modulation frequency of 25 Hz and recorded between 250 and 800 nm. The data acquisition was performed by a personal computer and the PAS spectra were normalized with respect to the carbon black signal. In the photoacoustic measurements, the thermal diffusion length (μ_s) defines the sample nail [22] depth which contributes to the signal. This parameter is defined as $\mu_s = (d/\pi f)^{1/2}$, in which d is the sample thermal diffusivity and f the light modulation frequency. With low frequencies one can inspect at long depths beneath the nail surface, while higher frequencies probe the nail surface. This is the well known characteristic of this technique, widely used to perform depth profile analysis. Taking f = 25 Hz and the thermal diffusivity of the nail measured before as $d = 8.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ [23], the studied samples present thicknesses varying from 400 to 600 μm . The samples were excited first onto the sample external face and after that they were turned upside down to impinge the light in the sample internal face. In this way, the detection of the fraction FF optical absorption bands at the internal side of the sample means that the applied substances propagated through the wound.

4. Conclusions

In conclusion, *Piper regnellii* showed effective antifungal activity, although the isolated compounds eupomatenoid-3 and eupomatenoid-5 showed low activity when compared the dichloromethane extract and chloroform fraction. The incorporation of this fraction in a vehicle, nail lacquer, showed good permeation through the nail and good *in vitro* activity against *T. rubrum*. Furthermore, the dichloromethane extract was not able to bind ergosterol.

Acknowledgements

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, CAPES/CNPq, Fundação Araucária.

References and Notes

1. Weitzman, I.; Summerbell, R.C. The dermatophytes. *Clin. Microb. Rev.* **1995**, *8*, 240–259.
2. Stein, A.C.; Sortino, M.; Avancini, C.; Zacchino, S.; Poser, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 211–214.
3. Sortino, M.; Delgado, P.; Juárez, S.; Quiroga, J.; Abónia, R.; Insuasty, B.; Nogueras, M.; Rodero, L.; Garibotto, F.M.; Enriz, R.D.; Zacchino, S.A. Synthesis and antifungal activity of (Z)-5-aryldenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 484–494.
4. Costa, A.F. *Farmacognosia (Farmacognosia Experimental)*; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, Portugal, 1972; p. 380.
5. Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.D.; Prasad, A.K.; Wengel, J.; Olsen, C.E.; Boll, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **1997**, *6*, 597–673.
6. Silva, R.V.; Navickiene, H.M.D.; Kato, M.J.; Bolzani, V.S.; Média, C.I.; Young, M.C.M.; Furlan, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 521–527.
7. Freixa, B.; Vila, R.; Vargas, L.; Lozano, N.; Adzet, T.; Cañigueral, S. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 427–430.
8. Freixa, B.; Vila, R.; Ferro, E.A.; Adzet, T.; Cañigueral, S. Antifungal principles from *Piper fulvescens*. *Planta Med.* **2001**, *67*, 873–875.
9. Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. Screening of some plants used in brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027–1031.
10. Koroishi, A.M.; Foss, S.R.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. *In vitro* activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *117*, 270–277.
11. Vendrametto, M.C.; Santos, A.O.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. *Parasitol. Int.* **2010**, *59*, 154–158.
12. Luize, P.S.; Ueda-nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2126–2130.
13. Murdan, S. Drug delivery to the nail following topical application. *Int. J. Pharm.* **2002**, *236*, 1–26.

14. Elewski, B. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clinical Microb. Rev.* **1998**, *11*, 415–429.
15. Effendy, I. Therapeutic strategies in onychomycosis. *J. Eur. Acad. Derm. Venereol.* **1995**, *4*, S3–S10.
16. Marty, Jean-paul, L. Amorolfine nail lacquer: a novel formulation. *J. Eur. Acad. Derm. Venereol.* **1995**, *4*, S17–S21.
17. Danelutte, A.P.; Lago, J.H.; Young, M.C.M.; Kato, M.J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 555–559.
18. Prasad, N.R.; Anandi, C.; Balasubramanian, S.; Pugalendi, K.V. Antidermatophyte activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *91*, 21–24.
19. Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **2003**, *11*, 272–279.
20. Pessini, G.L.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; Cortez, D.A.G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 1115–1120.
21. Sowa, M.G.; Wang, J.; Schultz, C.P.; Ahmed, K.; Mantsch, H.H. Infrared spectroscopy investigation of *in vivo* and *ex vivo* human nails. *Vib. Spectrosc.* **1995**, *10*, 49–56.
22. Nuglisch, L.E.R.; Dias, D.T.; Sehn, E.; Bento, A.C.; Baesso, M.L.; Santos, S.T.S.; Fushimi, M.Y. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail. *J. Phys. IV* **2005**, *125*, 631–633.
23. Dias, D.T.; Nuglisch, L.E.R.; Sehn, E.; Baesso, M.L.; Medina, A.N.; Bento, A.C. Human nail thermal diffusivity obtained using the open photoacoustic cell technique. *J. Phys. IV* **2005**, *125*, 657–660.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an Open Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**5. ARTIGO II: TOXICOLOGICAL EVALUATION AND PERMEATION
ON THE RABBIT'S EAR OF ANTIFUNGAL TOPICAL
FORMULATION CONTAINING EXTRACT OBTAINED FROM *Piper
regnellii* (Miq.) C. CD. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck
(Piperaceae) AGAINST DERMATOPHYTES**

**Andrea Mayumi Koroishi¹, Elizandra Sehn², Simone Rochtaschel Foss³, Eliana
Harue Endo¹; Mauro Luciano Baesso², Marli Miriam de Souza Lima^{1,5}, Maria
Raquel Marçal Natali⁴; Tânia Ueda-Nakamura^{1,6}, Celso Vataru Nakamura^{1,6};
Diógenes Aparício Garcia Cortez^{1,5}; Benedito Prado Dias Filho^{1,6*}**

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

² Pós-graduação em Física, Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil;

³ Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil.

⁴ Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

⁵ Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

⁶ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed: bpdfilho@uem.br; Tel.: +55 44 30114135; Fax: +55 44 30114109

ABSTRACT

Dermatophytes colonized outer layers of epidermis and infections caused by them are named mycoses. Antifungal drugs of topical use have to be delivery in the stratum corneum to inhibit growth or kill the fungi, and the concentration must be efficient to reach the fungi. Several disadvantages of current antifungal indicate the search for new molecules which provide a better efficacy. Plants are sources of bioactive molecules and the *Piperaceae* family is a good example, because it has many species with different biological activities already reported scientifically. *Piper regnellii* has showed activity against various microorganisms, including bacteria, protozoa, dermatophytes and others. Due to the diversity of bioactives compounds derived from plants, they could be incorporated in formulations to treat diseases. Because the antifungal activity of extracts of *P. regnellii* against dermatophytes reported in previous studies, this paper aimed to develop a topical formulation containing extract obtained from leaves of this specie. The model of study to evaluate the formulation action was albino New Zealand rabbits, and formulation was applied in right ear for a maximum 30 days. During the treatment, the animals did not show physic change, especially in the skin of ear. The blood and ears were collected and subjected to hematological, biochemical and histological analysis. Beyond the macroscopic characteristics, the ears were also submitted to microscopic evaluation, as presence of comedones and acanthosis on epidermis. The photoacoustic spectroscopy (PAS) was used to analyze the formulation permeation through the skin. The analysis showed that the formulation did not induce toxicological effects, confirmed by hematological and biochemical tests. So, the formulation was not able to induce comedogenic potential and acanthosis, and the data obtained by PAS showed that the formulation probably did not permeated into skin, and this result is

good because the formulation used to treat mycose should not delivery the deep interior.

Key words: *Piper regnellii*, dermatophytes, toxicological evaluation, topical formulation

1. INTRODUCTION

Rudolf Virchow was the first researcher to use the term mycose in 1856 that means infections produced by parasites microfungi with great importance in clinical tropical medicine. These microorganisms invade several types of tissues and infections are divided in three groups of dermatological interest, mycoses, general clinic and surgical (NEGRONI, 2010). The dermatophytosis is a type of superficial mycose and it is caused by the dermatophytes which involve 45 species framed in three genera *Trichophyton*, *Microscoporum* and *Epidermophyton* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Dermatophytes colonize outer layers of epidermis and drugs must have good liberation in the stratum corneum, whose activity should be efficient to kill or inhibit growth (PERSHING et al., 1994; WEBSTER, 2001). And then, the compound and excipient must have physic-chemical characteristics for appropriate permeation (MURDAN, 2002). Many of antifungal drugs are used to treat fungal infections but, in superficial mycose caused by dermatophytes, drugs as griseofulvin, azoles and allylamines are commonly used in medical clinic (HECTOR, 2005).

According to Odds (2003), the search of new antifungal should be reasoned in essential macromolecules for survival, growth, virulence factors and cell morphogenesis. In general, due to the large number of microorganisms, it is necessary the development of new drugs. Several factors as mechanisms of

resistance, emergence of new diseases, drug interactions, costly, side effects and low bioavailability of the drug lead to the search for new molecules which should be more actives, with broad spectrum of action and reducing the factors mentioned above.

For this reason, plants are great sources of new bioactives molecules that synthetize important secondary metabolites which act as attraction of pollinators, resistance toward insects and against microbial infection. There are a large number of classes of secondary metabolites with antimicrobial properties as protein, flavonoids, tannins, alkaloids, chromones, lignans, neolignans, terpens, sesquiterpens and others. *Piper regnellii* (*Piperaceae*) has compounds against many of microorganism, including bacteria (HOLETZ et al., 2002; PESSINI et al., 2003), protozoa (LUIZE et al., 2006; VENDRAMETTO, 2010), dermatophytes (KOROISHI et al., 2008).

The diversity of studies of bioactives compounds of plants, which should be better enforced, in other words, they should be incorporated in topical formulations, or other types of formulations, to really treat diseases. For example, *Glaucium grandiflorum* is used in Iranian traditional medicine to cure dermatitis, its extract was added to cream base with the purpose anti-inflammatory and analgesic. This formulation showed an effect similar to piroxicam gel (MORTEZA-SEMNANI et al., 2004). Due to activity of *Piper betle* against *Trichophyton mentagrophytes* with IC90 of 230.4 µg/ml, whose extract was incorporated in cream and proved very effective (TRAKRANRUNGSIE et al., 2008).

The administration of topical products, as cosmetics or drugs, may trigger inflammation as the most common effect. This reaction is characterized by warmth, redness, swelling and pain (ROMANOWSKI; SCHUELLER, 1997). The epidermis is

divided into basal layer (cuboidal cells), spinous layer (cuboidal cells or slightly flattened), granular layer (increase of keratin, flattened cells and central nucleus) and stratum corneum (superficial flattened cells, dead and no nucleus), with cell renewal, the microorganisms are removed from the outer surface epidermal (WAGNER; SOHNLE, 1995). The topical products may cause comedones whose formation is the first step of inflammatory process. During the comedogenesis process, there are two changes in keratinization process, hyperproliferation of keratinocytes layer in the follicle wall and reduced desquamation due to increased cohesion between keratinocytes (FARRAR; INGHAM, 2004).

Photoacoustic spectroscopy (PAS) is a technique non invasive helpful to determine penetration and distribution profile of compounds through the skin in both *in vivo* and *in vitro* tests and this demonstrate the importance of this technique in research of formulations of topical use (SEHN et al., 2009).

In this study, the crude extract obtained from leaves of *P. regnellii* was incorporated into a non-ionic A/O emulsion. The formulation was tested in rabbits, and then, the toxicological evaluation was done, which included hematological and biochemical analysis of the blood, histopathological evaluation and photoacoustic analysis of permeation in the ear.

2. METHODOLOGY

2.1. *Plant material*

The leaves of *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (*Piperaceae*) were collected in the “Horto Didático de Plantas Medicinais Prof. Irenice Silva” of the

Universidade Estadual de Maringá, Paraná. A voucher specimen was deposited at the Herbarium in the UEM, the number is HUM 8392. The leaves were dried in oven and then submitted to milling.

2.2. Hydroethanolic extract preparation

The powder of leaves were ground in a maceration with ethanol:water (9:1) at room temperature and stirring until the total depletion. The solvent was removed using rotary evaporator at 40 °C, was obtained two phases, aqueous and dark green extract (residue). The phase aqueous was lyophilized and the residue was washed with dichloromethane which was removed to give the dichloromethane extract, and stored in the freezer.

2.3. Preparation of topical formulation

The emulsion non-ionic (A/O) formulation was prepared by the following procedure. The dichloromethane extract was diluted in isopropyl myristate. The oil phase was constituted by stearic acid (1.83%), glycerin monostearate (6.83%), solid vaseline (14%), cetyl alcohol V (12.5%), ethoxylated lanolin (3.33%), then, was weighted and melted to approximately 70 °C. The aqueous phase at the same temperature was added to oil phase and mixed with the help of a pistil until the total cooling. After, the extract was incorporated. Two formulations were prepared. The first contain extract and the second has not. The formulations were stored in plastic bottles.

2.4. Animals

In this experiment were used adult male and female albino New Zealand rabbits weighing around 2.5 Kg, were obtained from the “Fazenda Experimental de Iguatemi” – UEM were used. The animals were maintained in individual cages for 15 and 30 days, the following rental terms with water and chow will. 54 animals were used and divided into three groups, control, treated and control of base, and subdivided each group in 15 days and 30 days of treatment. This study was approved under the protocol CEEA n. 023/2009 by the Committee on Ethical Conduct in the Use of Animals in Experimentation – UEM.

2.5. Treatment of animals with topical formulation

Every day, before of the treatment, the rabbit's ears were cleaned with distilled water every day. The application of the formulation was made in concave areas of the right ears of animals once a day by 15 and 30 days. As control, distilled water was applied on the left ears. Besides, the control animals received only distilled water in both ears. In the groups control and treated there were 6 male and 6 female animals. Only, the control of base consisted of males.

2.6. Toxicological evaluation

The study was realized based on Resolution-RE n° 90, ANVISA (2004), which is guide for the realization of studies of pre-clinical toxicity of herbal medicines. Before the animals were sacrificed, approximately 10 ml of blood was collected by venous cardiac puncture from each animal. The samples were submitted to hematological

and biochemical analysis. The first one, erythrocytes and leucocytes were quantified. And the biochemical analysis of protein total, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were made using a Labtest Diagnostica Kit, and the absorption optical was performed according to the rules of each test recommended by the manufacturer, in a Varian Cary/1E UV visible.

2.7. Morphological evaluation skin of rabbit ear

2.7.1. Macroscopy evaluation

After cleaning the ears and before application of formulation, it was analyzed whether there was presence of irritation reactions like to erythema, edema, epithelial desquamation, inflammation process and comedones.

2.7.2. Fixation and staining using the technique of hematoxylin – eosin (HE)

Samples for histological evaluation were collected at the 15th and 30th day, the animals were sacrificed by overdose of sodium thiopental 40mg/Kg, followed by removal of the ears with 3 cm length of right and left ears, which were fixed in Bouin's solution for 12 hours, dehydrated using graded concentration solution of ethanol (70, 80, 90 and 100%), diaphanized in xilol and embedded in histological paraffin. Transverse semi-serial sections of 7 μm of thickness were obtained using a Leica RM 2245 microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with a steel knife. The histologic sections were stained with hematoxylin and eosin to evaluate microscopically.

2.7.3. Microscopy evaluation

The histological analysis was to determine the potential comedogenic (capacity to induce the development of comedones), acanthosis (increasing thickness of the epidermis) and presence of inflammatory infiltrate. For the potential comedogenic the sections were measured with 10X ocular objective containing micrometer disc (ruler), using the factor of correction 10. The size of comedones were separated into groups, small ($<400\mu\text{m}$), medium (between $400 - 850\mu\text{m}$) and large ($>850\mu\text{m}$). Each type of comedone was multiplied by a factor attributed, as 0.5 to small, 2 to medium and 5 to large. This determine individual score (ISc), but it is necessary to determine the total score, which is possible to get through the media group's score (MSc). The values of MSc describe the potential of comedones, as none ($\text{MSc} \leq 10$), light ($10 < \text{MSc} \leq 30$), moderate ($30 < \text{MSc} \leq 90$) and severe ($\text{MSc} > 90$). For evaluation of local tolerance it was observed the presence of acanthosis and inflammatory infiltrate, using the numeric scale between 0.5 and 3 and zero for absence, that based on the thickness of the epidermis and increase in the number of cells that make up the stratum corneum. The acanthosis' scale is divided in 0.5 (increase of 10 to 50%), 1 (increase of 51 to 100%), 2 (increase of 101 to 150%) and 3 (above 150%). To analyze acanthosis 40X ocular objective and the correction's factor was 2.5 was used. Finally, regarding inflammatory infiltrate there is a scale too. It is divided in groups, 0.5 (very small increase of inflammatory cells), 1 (small increase), 2 (moderate increase) and 3 (severe increase and presence of eosinophils and abscesses formation) (TRUISTE et al., 2007).

2.8. Photoacoustic spectroscopy measuments of the ears

For this experiment 6 animals were used, they were treated with topical formulation containing or not extract. The procedure was performed in time intervals of 0, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes, and 30 days of treatment. After death of animals, treated ear was collected and cartilages were removed, remaining the stratum corneum, the epidermis and the dermis. The sample was placed in a cell with a support for the sample with dimension of 5mm in diameter and 2mm thick, sealed with a quartz window, which permit the incidence of radiation on the sample. The Lock-in amplifier was from EG & G Instruments (model 5110). The monochromatic light was obtained from a 1000W xenon arc lamp (Oriel Corporation 68820) and a monochromator (model 77250, Oriel Instruments). First, the sample was placed with the epidermal part was put up, in the cell to analyze the modulation frequency was 40 Hz. After, the dermis was analyzed in the frequency 10 Hz. The light absorbed by the sample excite the molecules, releasing energy, which is transferred as heat for the air in contact the sample, this generated sound captured by the microphone. With the variation of frequency of modulation incident light, it is possible to trace the depth profile of the material in the permeate sample. The thermal diffusion length (μ_s) is defined as the depth which the heat waves generated may propagate to the surface and contribute to the generation of photoacoustic signal. The value μ_s is defined as $\mu_s = (d/\pi f)^{1/2}$, μ_s is length of thermal diffusion (cm), d is thermal diffusivity (cm^2/s) and f is a modulation frequency of the light beam (Hz). The modulation frequency was 10 and 40 Hz and recorded between 200 to 450nm to perform the PAS spectra, which normalized with respect to the carbon black signal, considering the skin's diffusivity of $4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation of all groups divided by treatments. The statistical analysis was performed using the software Statistica 8.0. Statistical significance was determined using one-way ANOVA following the Dunnett's test to compare of treated group against the control group by multiple comparisons. The level of significance was set as P -value was less than 0.05.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The rabbits are used in several studies of toxicological evaluation in animals. Biochemical evaluation is necessary because the drugs may interfere with the function of various organs. Every day, the ears were analyzed macroscopically and there were not characteristics of erythema, edema, desquamation, inflammatory reactions or comedogenic effects, and the treated skin is not oily presented. There were not observed behavioral alterations and weight. According to the Table 1, the parameters were normal for all groups studied, which included total protein, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase that are used to check liver and kidney alterations. Regarding hematological results, erythrogram, platelets and leucogram did not show alterations (Table 2 and 3). The hemogram is used for diagnosis and control of various diseases, which also indicate abnormalities in the production, duration and destruction of blood cells, acute or chronic infection, allergy and abnormal clotting (MOTTA, 2009).

Truite et al. (2007) verified toxicity of phytotherapics formulations for vitiligo treatment, it was seeing that these formulations did not promote biochemical and

hematological alterations, and others factors, as comedogenic potential, macroscopy evaluation, they also had not significant differences. Kanjanapothi et al. (2004) investigated toxicity in rats of ethanolic extract of *Kaempferia galanga* suspended in 5% Tween 80 was administered orally by gavaging. Abnormalities and histopathological changes were not detectable between all control and treated animals, and biochemical and hematological analysis showed no differences, but there was slight decrease of differential count of leukocytes.

The rabbits were submitted for diet containing *Catha edulis* leaves for six months and liver enzymes were quantified on the plasma. There was significant increase in plasma levels of alkaline phosphatase, an increase of indirect bilirubin with a concomitant decrease in direct bilirubin levels. Sections of liver displayed increase chronic inflammation (AL-HABORI et al., 2002).

According to Table 4, the topical formulation tested shows be light potential comedogenic, in other words, when treated and control groups of different treatment periods are compared there are not significant differences, the *p* value is higher than 0.05. Comedogenic potential is grouped according to the mean the group's score (MSc). In treated animals, the left ear was used as control, just receiving distilled water, and right ear was treated with the topical formulation. Moreover it was also compared between the control and treated animals. The control group was treated only with distilled water in both ears. It was observed predominance of small comedones as showed in Figure 1, which shows the size of comedones below 400 μm . Moreover, in this figure are showed open and close comedones. The degree of acanthosis is determined by comparing epidermal thickness of the left and right ears. It was seen that there were not significant difference between the treated and control groups of periods. In fact, the presence of inflammatory infiltrate was not observed in

all ears. The data of all parameters analyzed in animals treated with topical formulation without extract (only the base) were not showed in the tables, but the animals treated with the test topical formulation showed similar results those groups treated only with the base.

Many of products of topical application may cause the comedone formation. Some researches found that application made in the outer ear canal of albino rabbits of New Zealand is a good model to study the comedogenic potential. They applied the product to be tested in the rabbit's ears and observed the appearance of comedones every day, during two weeks. Next, the product was classified according to its comedogenic potential (ROMANOWSKI; SCHUELLER, 1997). The rabbit's ear is a model very useful for research of topical skin irritations and follicular irritants. In human skin, the response to produce some kind of problem is slow and it may take up to 6 months for many commercial products. However, the rabbit's ears are so sensitive and the response to daily application of a test agent appears in two weeks, for example superficial erythema and desquamation and a follicular keratosis (FULTON Jr. et al., 1984).

The rabbit ear model was developed by Kligman and Mills (1972) and Kligman and Kwong (1979) verified the comedones appearance as discrete, uniform sized, cylindrical to globular horny masses and the size is proportional to the potency of the test products. The acanthosis is another parameter necessary to analyze epidermis of ears, moreover, it is the increase of thickness of epidermis with increased cell number and/or nuclei in the basal layer. Kanjanapothi et al. (2004) observed that hexane fraction of *K. galanga* dissolved in ethanol when applied to dorsal skin of the trunk, it was not able to dermal irritation on the rabbits' skin.

The photoacoustic spectroscopy is a technique important to analyze permeation of the formulations of topical use. The skin has absorption in visible spectrum of violet around 400 nm due to disintegration of melanin giving yellow staining of skin. Before analysis in the ear, the absorption spectrum of topical formulation was analyzed (Figure 2). Figure 3 shows the absorption of spectrum of tested formulation at light modulation frequency of 40 Hz (permeation in skin). It's possible that the topical formulation tested has the same absorption of skin because of this could not be possible to see differences increasing the duration of treatment, moreover, the profile curves of the treated skin at all times and untreated skin were similar in both the analysis of the top as the bottom. In the lower part the same result was observed (Figure 4), but the frequency used was 10 Hz. Figures 5 and 6 show the spectrum absorption in the treatment of 30 days, comparing with other spectrum results showed the same profile.

Sehn et al. (2003) verified the permeation of three sunscreens into the human skin *in vivo* by this technique and the results evidencing the sensibility of this technique to evaluate of permeation of compounds through the skin. The PAS was also used to check the penetration of an ointment containing bee propolis for the treatment of wound healing, and was confirmed that the formulation permeated reaching deeper area of the wound (SEHN et al., 2009).

Topical formulation analyzed for toxicological and permeation evaluation showed satisfactory results, mainly by hematological and biochemical evaluation which did not show differences between control and treated groups, and the formulation has light comedogenic potential. Furthermore, it is expected that the formulation had permeated into the skin but only superficial layer, because mycoses caused by dermatophytes are mainly in the surface layer of the skin.

Table 1 – Biochemical evaluation of rabbits' blood ($n = 6/\text{group}$). Data were expressed as mean \pm SEM

	GROUPS DIVIDED BY PERIOD OF TREATMENT							
	TREATMENT BY 15 DAYS				TREATMENT BY 30 DAYS			
	MALES		FEMALES		MALES		FEMALES	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Total proteins	6.42 \pm 0.40	6.31 \pm 0.44	7 \pm 0.25	6.17 \pm 0.69	6.37 \pm 0.5	6.66 \pm 0.45	5.70 \pm 0.38	6.33 \pm 0.32
Alkaline phosphatase	7.19 \pm 3.87	6.93 \pm 2.59	5.10 \pm 0.47	11.86 \pm 4.08	11.75 \pm 6.1	7.36 \pm 3.77	9.42 \pm 5.02	13.74 \pm 7.21
AST	95.9 \pm 30.4	90 \pm 28	93 \pm 26	63 \pm 2.65	72.2 \pm 24.5	101 \pm 22.4	78.8 \pm 22.3	89 \pm 43.1
ALT	36.2 \pm 11.8	29.2 \pm 7.75	40.4 \pm 12.2	34 \pm 17.5	23.5 \pm 5.41	31.9 \pm 11.8	31.3 \pm 13.2	28.17 \pm 2.93

* Dunnett's test with significance $P < 0.05$, all the analysis showed no significance differences in relation control group. Units of reference: Total proteins – g/dL; Alkaline phosphatase – U/L; AST (aspartate aminotransferase) – U/L; ALT (alanine aminotransferase) – U/L.

Table 2 – Erythrogram and platelet series of hematological evaluation ($n = 6/\text{group}$). Data were expressed as mean \pm SEM.

GROUPS DIVIDED BY PERIOD OF TREATMENT								
	TREATMENT BY 15 DAYS				TREATMENT BY 30 DAYS			
	MALES		FEMALES		MALES		FEMALES	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Platelets	352.2 \pm 92.04	322 \pm 34.61	317 \pm 51.31	370 \pm 35.3	389.4 \pm 75.89	344.28 \pm 44.27	314 \pm 67.26	375.5 \pm 9.2
Erythrogram								
Erythrocytes	6.32 \pm 0.49	6.48 \pm 0.31	6.25 \pm 0.76	6.43 \pm 0.41	6.46 \pm 0.25	6.50 \pm 0.68	5.7 \pm 0.41	6.35 \pm 0.21
Hemoglobin	12.92 \pm 0.95	13.03 \pm 0.7	13.05 \pm 0.79	12.85 \pm 0.73	13.20 \pm 0.61	12.87 \pm 1.06	11.95 \pm 0.7	12.85 \pm 0.35
Hematocrit	42.66 \pm 3.12	42.30 \pm 1.97	43.08 \pm 1.85	42.45 \pm 3.33	43.06 \pm 2.15	41.81 \pm 2.42	38.83 \pm 2.34	41.85 \pm 2.33
M. C. V.	67.62 \pm 3.92	65.26 \pm 1.55	69.48 \pm 6.49	66.1 \pm 3.4	66.66 \pm 1.71	64.61 \pm 3.34	68.18 \pm 2.7	66 \pm 5.94
M. C. H.	20.5 \pm 0.95	20.3 \pm 0.47	21 \pm 1.27	20.03 \pm 0.31	20.42 \pm 0.28	19.9 \pm 0.65	20.98 \pm 0.34	20.25 \pm 1.2
M. C. H. C.	42.66 \pm 3.11	31.08 \pm 0.39	43.08 \pm 1.85	30.35 \pm 1.37	30.68 \pm 0.78	30.81 \pm 0.84	30.8 \pm 0.82	30.7 \pm 0.85

* Dunnett's test with significance $P < 0.05$, all the analysis showed no significance differences in relation control group. Units of reference: platelets – 10^3 cell/ μL , erythrocytes – 10^6 cell/ μL ; hemoglobin – g/dl; hematocrit - %; mean corpuscular volume (M. C. V.) - μ^3 ; mean corpuscular hemoglobin (M. C. H.) – pg (picograms); mean corpuscular hemoglobin concentration (M. C. H. C.) - %.

Table 3 – Leucogram of hematological evaluation ($n = 6$ /group). Data were expressed as mean \pm SEM.

Leucogram	GROUPS DIVIDED BY PERIOD OF TREATMENT							
	TREATMENT BY 15 DAYS				TREATMENT BY 30 DAYS			
	MALES		FEMALES		MALES		FEMALES	
Leucogram	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Leucocytes	8.27 \pm 2.23	7.88 \pm 2.71	7.97 \pm 1.08	7.45 \pm 2.65	6.41 \pm 0.8	7.7 \pm 1.5	6.87 \pm 1.43	8.12 \pm 0.04
Rods	0.95 \pm 0.47	0.93 \pm 0.26	0.83 \pm 0.09	1.07	1.26 \pm 0.53	0.87 \pm 0.27	1.44 \pm 0.83	1.21 \pm 0.57
Segmented	2.7 \pm 1.05	2.63 \pm 0.93	2.16 \pm 0.56	2.67 \pm 1.11	1.8 \pm 0.37	1.56 \pm 0.14	2.36 \pm 0.64	2.44 \pm 0.47
Basophils	1.64 \pm 0.38	1.11 \pm 0.18	2.79 \pm 1.01	1.53 \pm 1.41	1.85 \pm 0.34	2.28 \pm 0.77	2.42 \pm 1.21	1.22 \pm 0.58
Typical lymphocytes	4.72 \pm 1.4	4.3 \pm 0.6	4.04 \pm 1.07	3.89 \pm 0.91	4.1 \pm 0.65	4.3 \pm 0.89	4.49 \pm 0.93	5.07 \pm 0.38
Monocytes	5 \pm 1.15	5.61 \pm 1.7	6.80 \pm 1.33	3.52 \pm 0.6	3.13 \pm 0.87	5.38 \pm 1.24	2.91 \pm 0.15	3.65 \pm 0.55

* Dunnett's test with significance $P < 0.05$, all the analysis showed no significance differences in relation control group. Units of reference: Leucocytes – 10^3 cell/ μ L; Rods – 10^2 cell/ μ L; Segmented – 10^3 cell/ μ L; Basophils – 10^2 cell/ μ L; Typical lymphocytes – 10^3 cell/ μ L; Monocytes – 10^2 cell/ μ L.

Table 4 – Microscopy evaluation of rabbit's ears ($n=6$ /group)

GROUPS DIVIDED BY PERIOD OF TREATMENT								
	TREATMENT BY 15 DAYS				TREATMENT BY 30 DAYS			
	MALES		FEMALES		MALES		FEMALES	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Microscopy evaluation								
Acanthosis	0.5	0.5	0.5	0.5	0	2	0	0.5
Inflammatory infiltrate	None	None	None	None	None	None	None	None
<i>Potential Comedogenic</i>								
Right ears (MSc)	9.8	11.4	12.4	10.3	9.3	10.8	8	9.3
Left ears (MSc)	7.2	6.9	5.1	11.9	12	7.4	9.4	13.7

* Dunnett's test with significance $P < 0.05$, all the analysis showed no significance differences in relation control group. The acanthosis's scale is divided in 0.5 (increase of 10 to 50%), 1 (increase of 51 to 100%), 2 (increase of 101 to 150%) and 3 (above 150%). The values of MSc describe the potential comedogenic, as none (MSc \leq 10), light (10 < MSc \leq 30), moderate (30 < MSc \leq 90) and severe (MSc > 90).

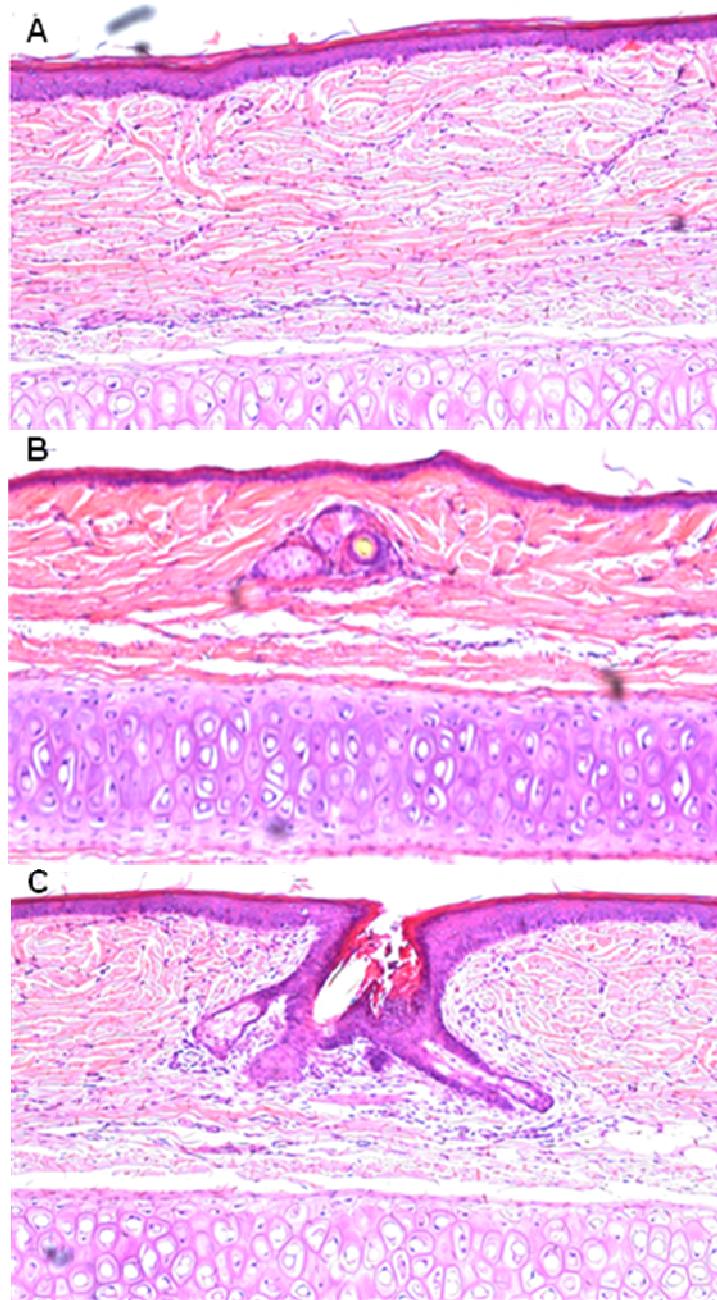


Figure 1 – Histological sections of rabbit's ears treated and not treated. (A) without comedone, (B) presence of closed and (C) open comedone, size smaller than 400 μm . Hematoxylin eosin staining technique, magnification of 100X.

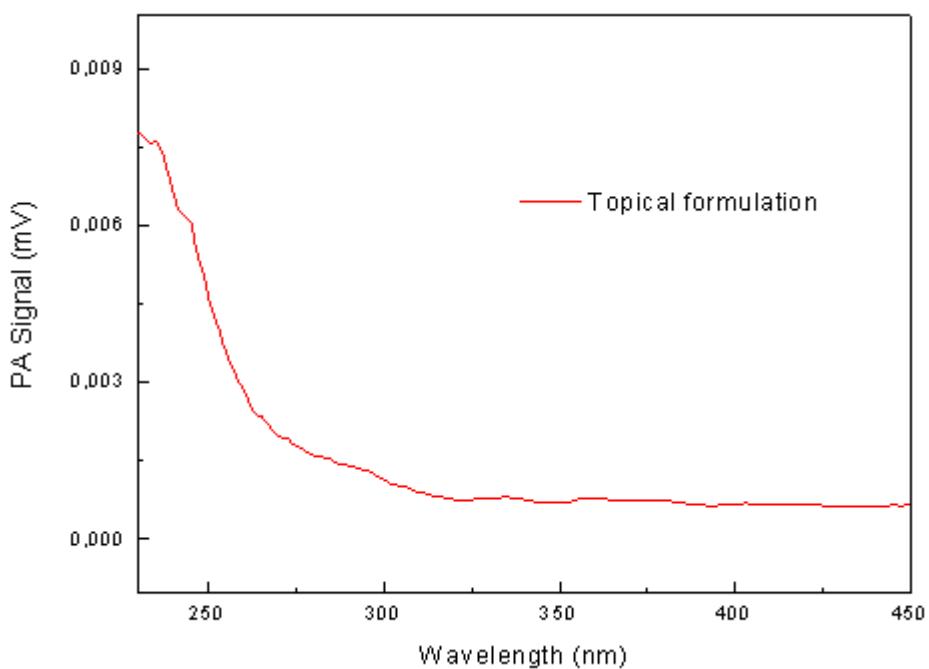


Figure 2 - Optical absorption spectra of the topical formulation

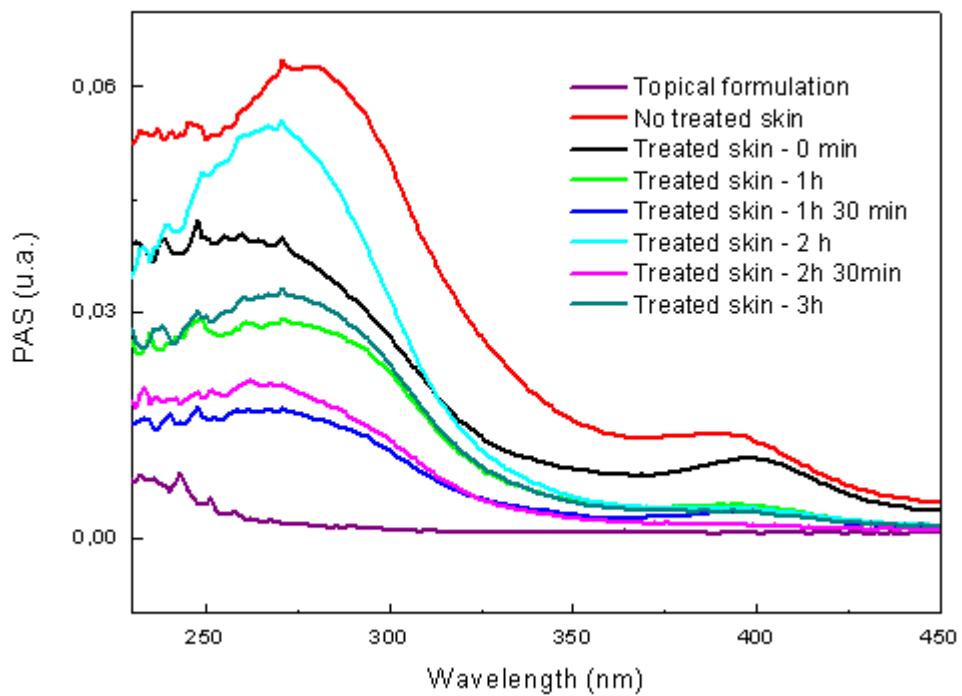


Figure 3 – Photoacoustic Spectroscopy Measurement, after treatment with topical formulation on rabbit's ear. The top of samples were analyzed to 40 Hz frequency, in the time between 0 to 3 hours of treatment.

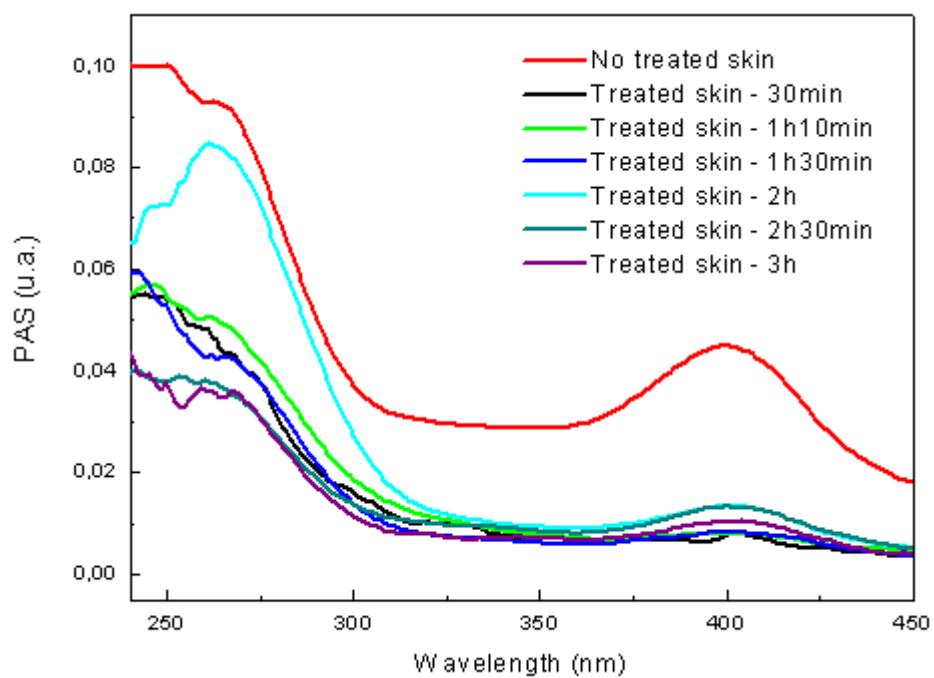


Figure 4 – Photoacoustic Spectroscopy Measurement, after treatment with topical formulation in rabbit's ear. The lower of samples were analyzed to 10 Hz frequency, in the time between 0 to 3 hours of treatment.

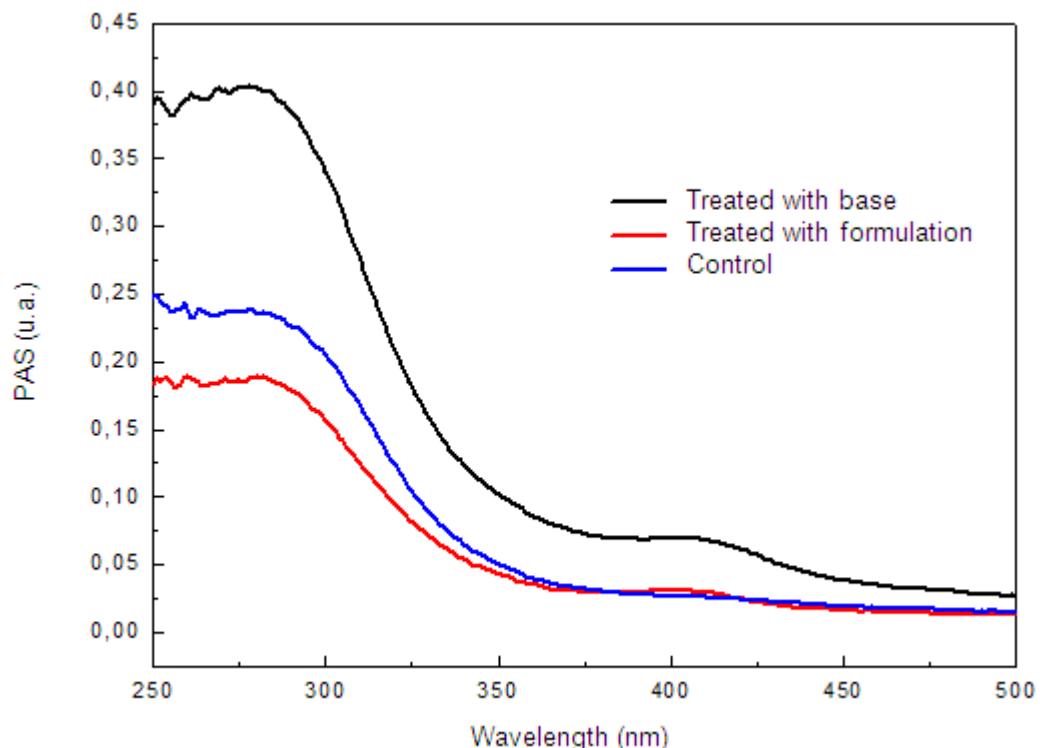


Figure 5 – Photoacoustic Spectroscopy Measurement, after 30 days of treatment with topical formulation in rabbit's ear. The top of samples were analyzed to 40 Hz frequency.

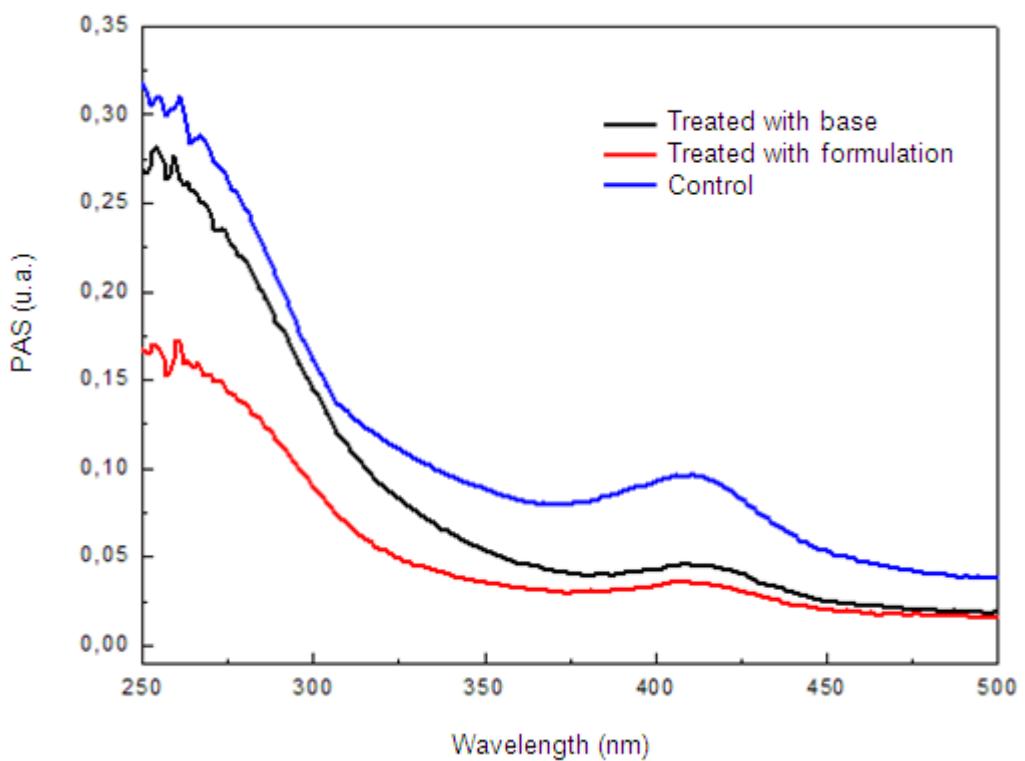


Figure 6 – Photoacoustic Spectroscopy Measurement, after 30 days of treatment with topical formulation in rabbit's ear. The lower of samples were analyzed to 10 Hz frequency.

4. REFERENCES

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2004. Available at: <HTTP://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242>. Acess: 01 jun. 2009.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 83, p. 209 – 217, 2002.

FARRAR, M. D.; INGHAM, E. Acne: Inflammation. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 22, n. 380, p. 380 – 384, 2004.

FULTON JUNIOR, J. E.; PAY, S. R.; FULTON, J. E. Comedogenicity of current therapeutic products, cosmetics, and ingredients in the rabbit ear. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 10, n. 1, jan., 1984.

HECTOR, R. F. An overview of antifungal drugs and their use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, p. 240 – 249, 2005.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, oct., 2002.

KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N.; TAESOTIKUL, T.; RUJJANAWATE, C.; KAEWPINIT, D.; SUDTHAYAKORN, R.; CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; PITASAWAT, B. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom), **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, p. 359 – 365, 2004.

KLIGMAN, A. M.; MILLS, O. H. Acne cosmetica. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 106, p. 843 – 850, dec., 1972.

KLIGMAN, A. M.; KWONG, T. An improved rabbit ear model for assessing comedogenic substances. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 100, p. 699 – 702, 1979.

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

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regmellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, p. 2126 – 2130, 2006.

MORTEZA-SEMNANI, K.; SAEEDI, M.; HAMIDIAN, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Glaucium grandiflorum*. **Fitoterapia**, Milano, v. 75, p. 123 – 129, 2004.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medbook – Editora Científica Ltda, 2009.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 236, p. 1 – 26, 2002.

NEGRONI, R. Historical aspects of dermatomycoses. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 28, p. 125 – 132, 2010.

ODDS, F. C. Antifungal agents: mechanisms of action. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272 – 279, jun., 2003.

PERSHING, L. K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, G. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 38, n. 1, p. 90 – 95, jan., 1994.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115 – 1120, dec., 2003.

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Fundamentos dos testes de segurança de produtos cosméticos, **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.9, p. 55 – 59, sept./oct., 1997.

SEHN, E.; SILVA, K. C.; RETUCI, V. S.; MEDINA, A. N.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment, **Review of Scientific Instruments**, Lancaster, v. 74, n. 1, jan., 2003.

SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S. L.; GONÇALVES, C. C. M.; BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee própolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 635, 115-120, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 760 p.

TRAKRANRUNGSIE, N.; CHATCHAWANCHONTEERA, A.; KHUNKITTI, W. Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of *Piper betle*, *Alpinia galanga* and *Allium ascalonicum* extracts *in vitro*. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 84, p. 80 – 84, 2008.

TRUITE, C. V. R.; PHILIPPSEN, G. S. UEDA-NAKAMURA, T.; NATALI, M. R. M.; DIAS FILHO, B. P.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; NAKAMURA, C. V. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 83, 1529-1536, 2007.

VENDRAMETTO, M. C.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomathenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 59, p. 154 – 158, 2010.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Research**, Washington, v. 8, n. 3, p. 317 – 335, jul, 1995.

WEBSTER, G. F. Topical medications: a focus on antifungals and topical steroids. **Clinica Cornerstone**, v. 4, n. 1, p. 33 – 38, 2001.

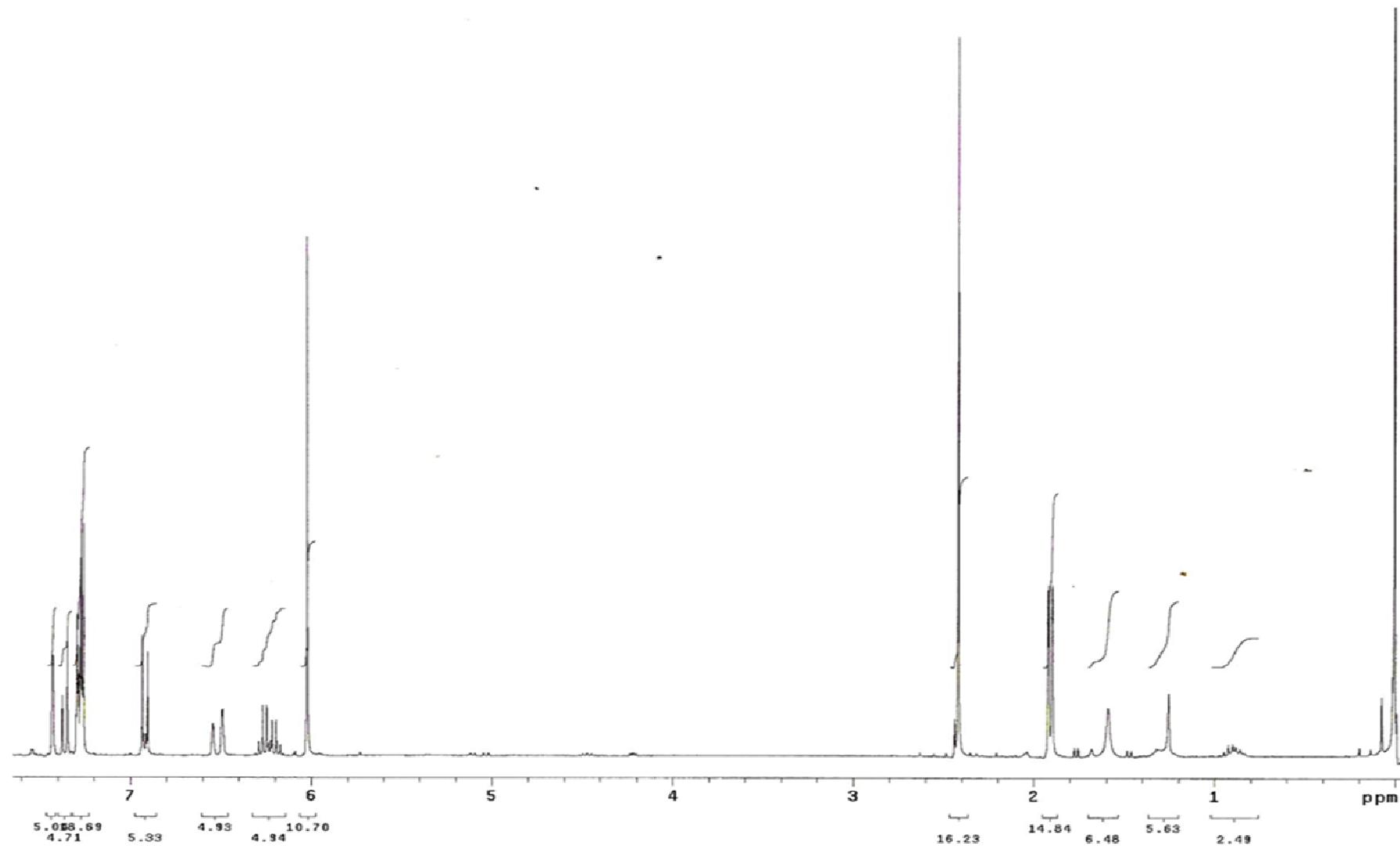
6. CONCLUSÕES

A partir das folhas de *P. regnellii* foram obtidos extrato diclorometano, fração clorofórmio e neolignanas, que foram submetidos a testes antifúngicos, e aplicados em duas formulações de uso tópico:

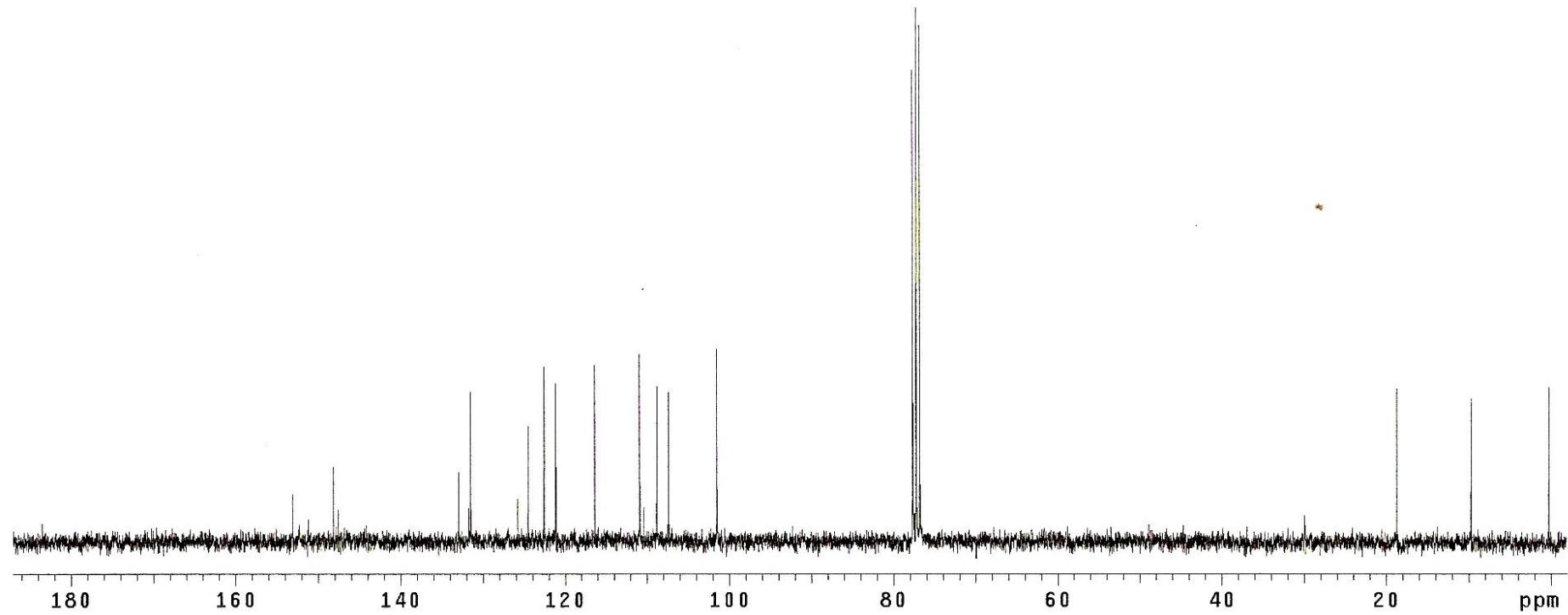
- ✓ O esmalte contendo fração clorofórmio reduziu o crescimento fúngico em testes *in vitro*, observadas por microscopia eletrônica de varredura. A formulação teve boa permeabilidade em unha, à freqüência de modulação de 20 Hz e apresentando picos de absorção a 670 nm.
- ✓ Estudos envolvendo coelhos são úteis no desenvolvimento de formulações tópicas, devido à semelhança com a pele humana e a resposta rápida à sensibilidade causada por substâncias aplicadas na pele desses animais.
- ✓ A emulsão antifúngica não promoveu reações teciduais nos animais durante o tratamento, assim como, nos testes toxicológicos envolvendo análises bioquímicas e hematológicas. Não houve diferenças significativas entre os grupos. Pela análise microscópica das orelhas, foi determinado que, a emulsão possui um leve potencial comedogênico, mas incapaz de induzir a acantose e processos inflamatórios.
- ✓ Com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a espécie *P. regnellii*, apresenta grande potencial antifúngico, contra dermatófitos, e as formulações contendo seus princípios ativos, possuem grande capacidade de tratar micoses causadas por estes micro-organismos.

7. ANEXOS

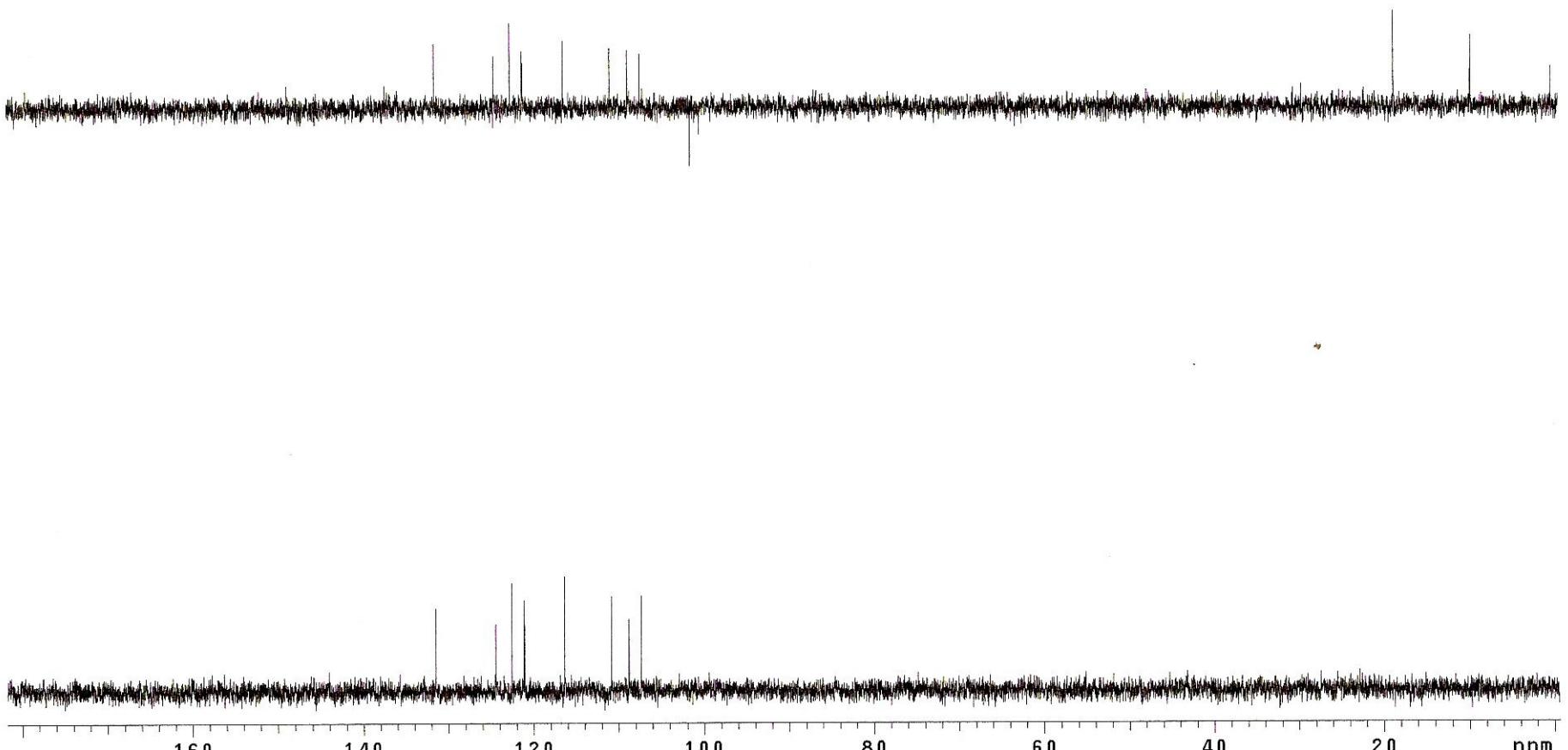
- As substâncias eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 foram analisadas a 300 MHz, diluído em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e obtidos os seguintes espectros:
 - ✓ Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
 - ✓ Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
 - ✓ Espectros de DEPT
 - ✓ Espectros de COSY
 - ✓ Espectros de HMQC
- Para a análise microscópica, as orelhas foram processadas por técnicas histológicas
- Para o experimento *in vivo* usando coelhos, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação;
- Patente depositada sob o número PI0704809-2 junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial e publicada na Revista da Propriedade Industrial n° 2003, pg. 71.



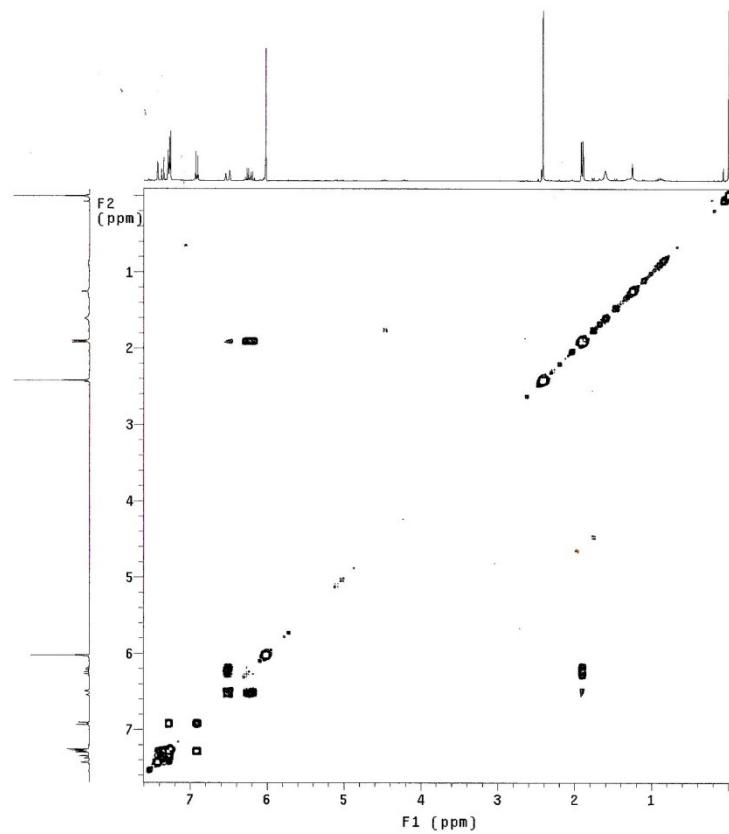
Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ do eupomatenóide-3 (300 MHz, CDCl_3)



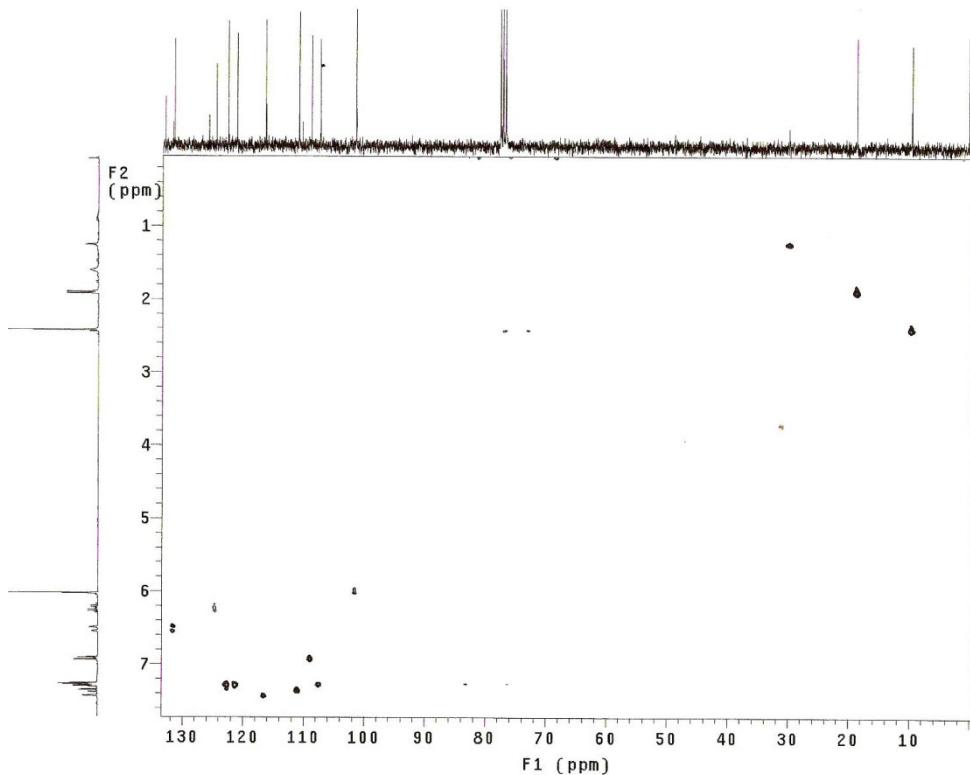
Espectro de RMN ^{13}C do eupomatenóide-3 (300 MHz, CDCl_3)



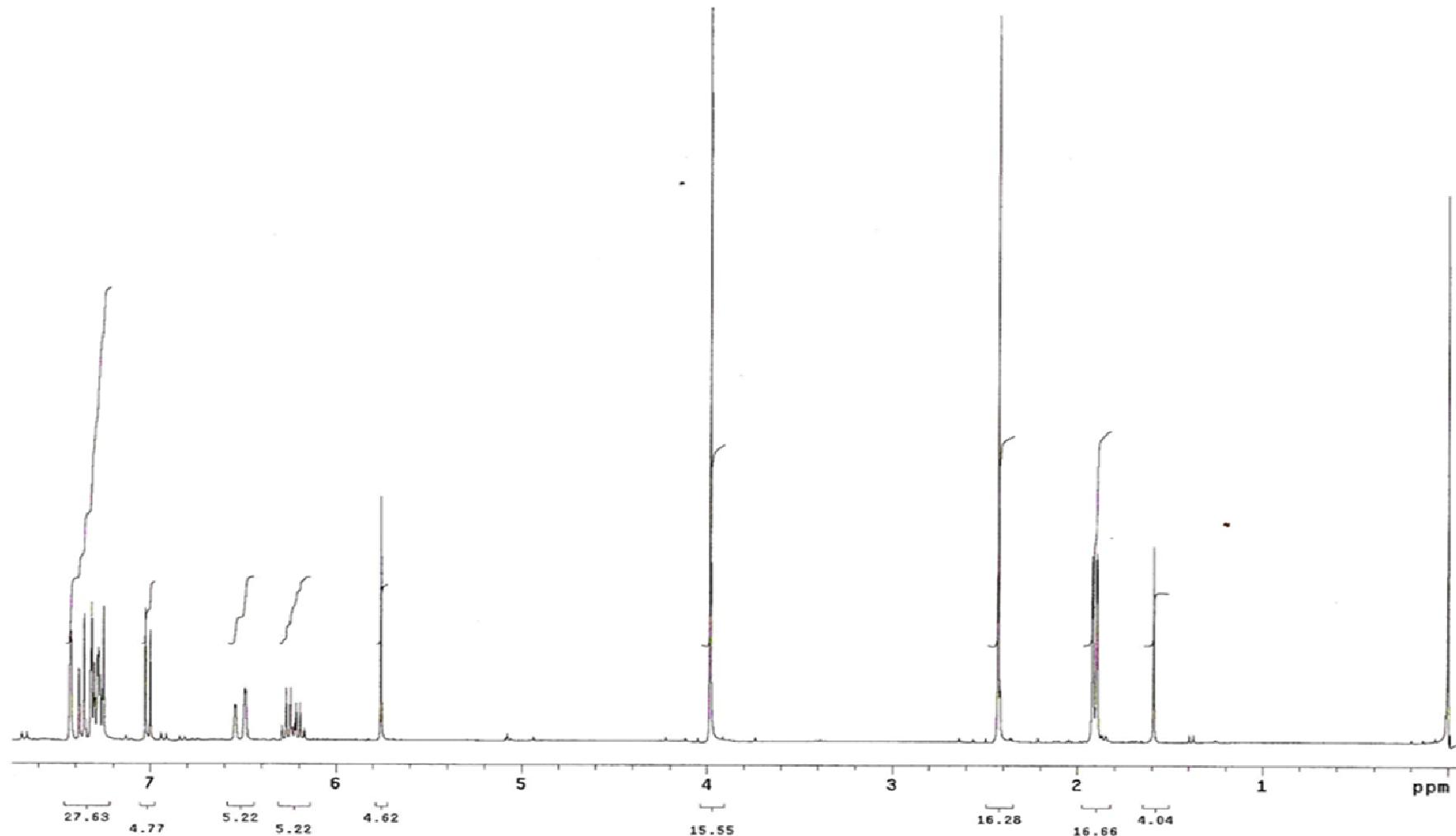
Espectro de DEPT do eupomatenóide-3 (300 MHz, CDCl_3)



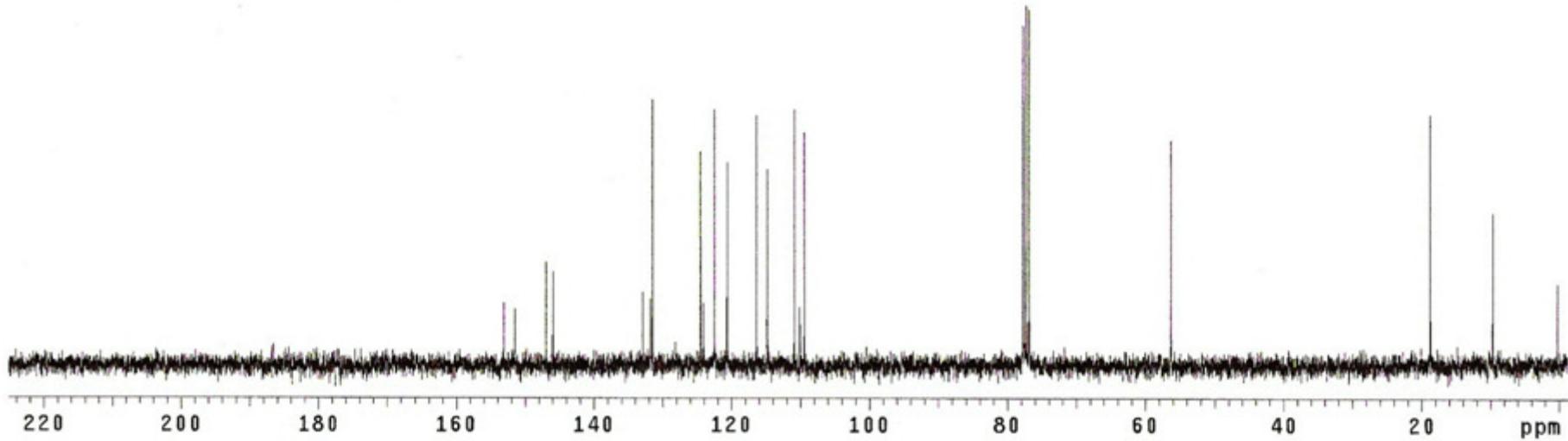
Espectro de COSY do eupomatenóide-3 (300 MHz, CDCl_3)



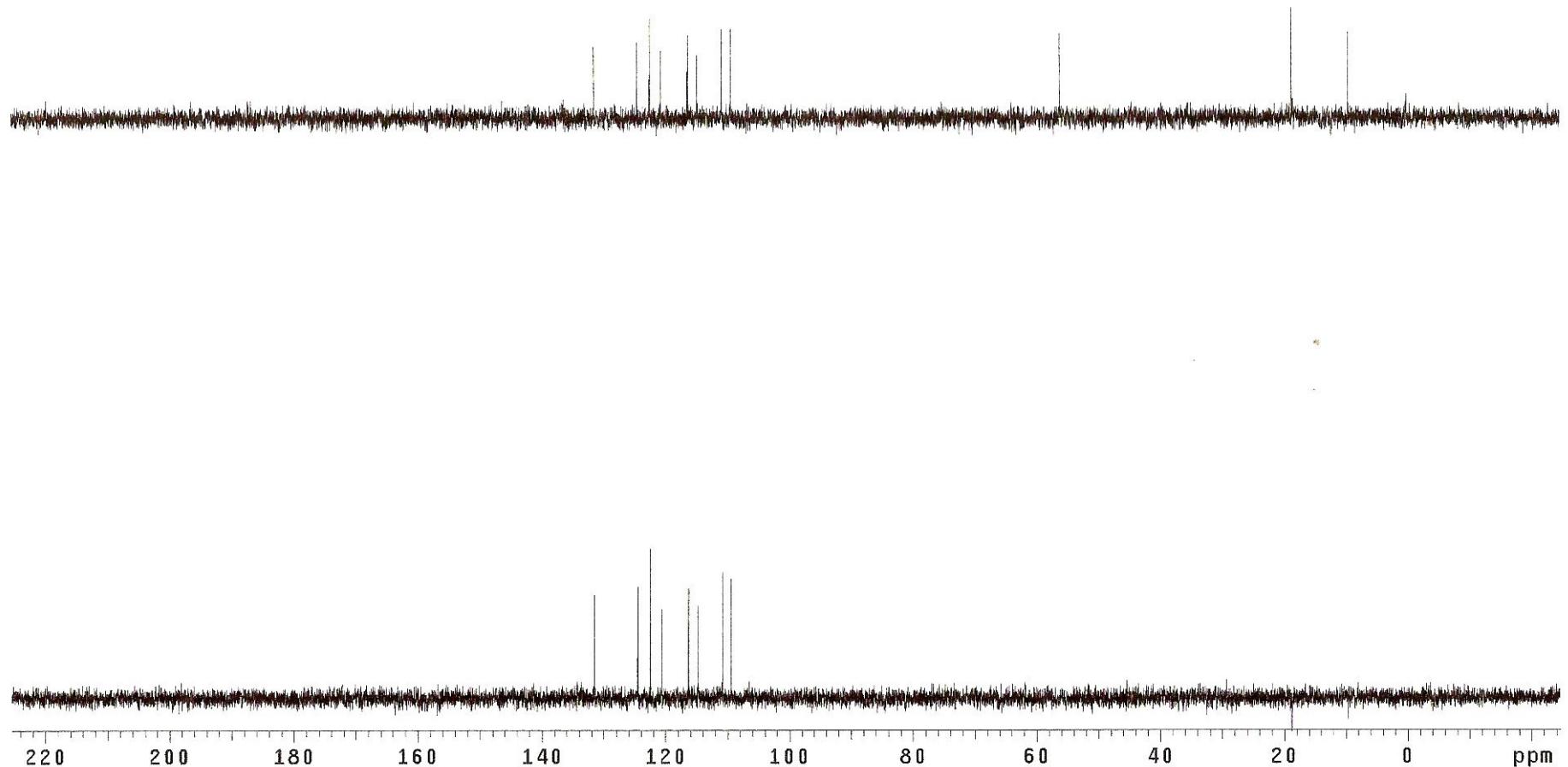
Espectro de HMQC do eupomatenóide-3 (300 MHz, CDCl_3)



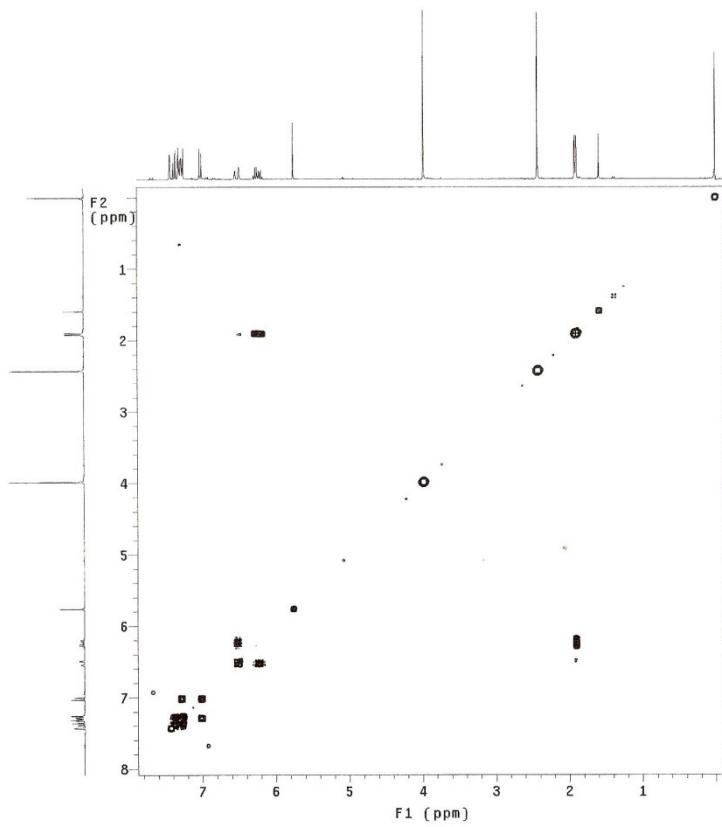
Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ do eupomatenóide-5 (300 MHz, CDCl_3)



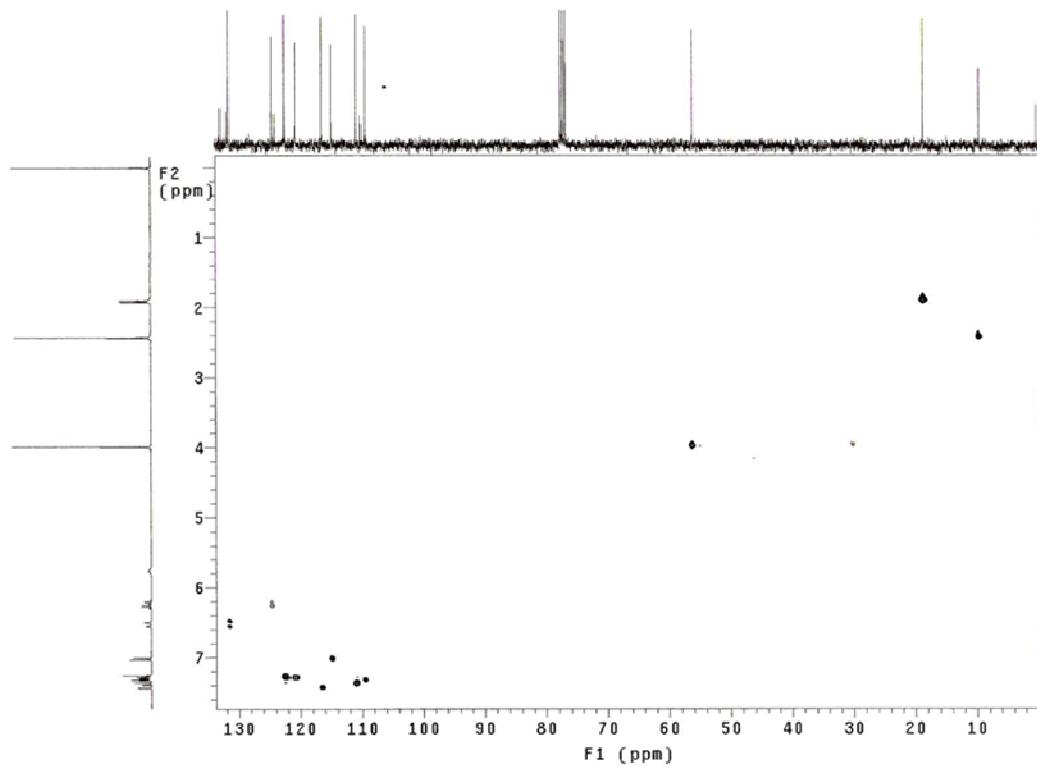
Espectro de RMN de ^{13}C do eupomatenóide-5 (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de DEPT do eupomatenóide-5 (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN COSY do eupomatenóide-5 (300 MHz, CDCl_3)



Espectro de RMN HMQC do eupomatenóide-5 (300 MHz, CDCl_3)

PROCESSAMENTO DAS ORELHAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

1^a ETAPA – FIXAÇÃO EM REAGENTE DE BOUIN

As orelhas foram fixadas por 24 horas em reagente de Bouin. Após o período, o reagente foi substituído por etanol 70%, deixado por no mínimo 24 horas.

2^a ETAPA – INCLUSÃO EM PARAFINA

Este processo consiste na desidratação em concentrações crescentes de etanol, seguido de diafanização com xilol e a inclusão em parafina histológica.

	ETAPAS	REAGENTES	TEMPO DE TRATAMENTO
I	Desidratação	Etanol 70%	No mínimo 24 horas
II	Desidratação	Etanol 80%	15 minutos
III	Desidratação	Etanol 90%	20 minutos
IV	Desidratação	Etanol 100%	30 minutos
V	Desidratação	Etanol 100%	50 minutos
VI	Desidratação	Etanol 100%	40 minutos
VII	Diafanização	Xilol	2 horas
VIII	Inclusão	Parafina	1 hora
IX	Inclusão	Parafina	2 horas
X	Inclusão	Parafina	Emblocamento

3^a ETAPA – CORTES EM MICRÓTOMO

Os blocos contendo os órgãos foram ajustados para que não haja desgaste da navalha do micrótomo, posteriormente, foram hidratados no mínimo 24 horas em geladeira. Foram feitos cortes transversais de 7 µm de espessura, usando micrótomo Leica RM 2245 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). O material foi

esticado em banho (água quente) e “pescados” com a lâmina, previamente tratada com soluções adesivas.

4^a ETAPA – COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

Inicialmente, as lâminas foram colocadas em estufa a 60 °C por 15 minutos.

Seguido dos seguintes processos:

	ETAPAS	REAGENTES	TEMPO DE TRATAMENTO
I	Desparafinização	Xilol	10 minutos
II	Desparafinização	Xilol	10 minutos
III	Hidratação	Etanol 100%	2 minutos
IV	Hidratação	Etanol 100%	2 minutos
V	Hidratação	Etanol 90%	2 minutos
VI	Hidratação	Etanol 80%	2 minutos
VII	Hidratação	Etanol 70%	2 minutos
VIII	Hidratação	Água destilada	2 minutos
IX	Coloração	Hematoxilina	15 segundos
X	Coloração	Água (Enxaguar 4 vezes)	5 minutos (em repouso)
XI	Coloração	Eosina	15 segundos
XII	Coloração	Água	Enxaguar 2 vezes
XIII	Desidratação	Etanol 90%	Passar
XIV	Desidratação	Etanol 100%	5 minutos
XV	Desidratação	Etanol 100%	5 minutos
XVI	Diafanização	Xilol:etanol (1:1)	Passar
XVII	Diafanização	Xilol	5 minutos
XVIII	Diafanização	Xilol	5 minutos

Para a preservação do material, foi feito a montagem da lâmina com a lamínula utilizando adesivo Permount.

* PREPARO DOS REAGENTES:

a. *Reagente de Bouin*

O reagente foi preparado pela mistura de 750 ml de ácido pícrico, 250 ml de formaldeído e 50 ml de ácido acético.

b. *Adesivo de Haupt*

Foi dissolvido 1 g de gelatina incolor em 50 ml de água destilada. Cerca de 2 g de fenol foram dissolvidos em 50 ml de água destilada. As duas soluções foram misturadas, e 15 ml de glicerina foram adicionados. O adesivo foi mantido em geladeira.

c. *Hematoxilina Harius*

Aproximadamente 1 g de hematoxilina foi dissolvido em 10 ml de etanol absoluto, e 20 g de alúmen de amônio em 200 ml de água destilada quente. As duas soluções foram misturadas e aquecidas rapidamente (sem deixar ferver). Após, foram adicionados 0,5 g de óxido de mercúrio. Após esfriar bem (se possível por em banho de gelo), 6 ml de ácido acético P. A. foram adicionados. Deixou-se maturar por 3 a 4 dias. Antes do uso, a solução foi filtrada.

d. *Eosina Y com floxina B*

i. Solução de eosina Y

2,5 g de eosina Y foram dissolvidos em 50 ml de água destilada e 200 ml de etanol 95%.

ii. Solução de floxina B

1 g de floxina B foi solubilizada em 100 ml de água destilada, e armazenada em geladeira.

iii. Solução de uso

Para a solução final, 88 ml de solução de eosina Y foram misturadas com 1 ml de solução de floxina B e 0,4ml de ácido acético.

TABELA UTILIZADA PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS ORELHAS

Número do animal	1	2	3	4	5	6
Secções examinadas	2	2	2	2	2	2
Comedos						
- grande						
- médio						
- pequeno						
Total						
Acantose						
Infiltrado inflamatório						
Outras observações						

Número do animal	1	2	3	4	5	6	Total ISc	MSc
Tipos de Comedos								
Grandes (x5)								
Médios (x2)								
Pequenos (x0,5)								
ISc								

ISc – índice do escore, MSc – Escore médio

Escore Médio (MSc)	Potencial Comedogênico
MSc ≤ 10	Nenhum
10 < MSc ≤ 30	Suave
30 < MSc ≤ 90	Moderado
MSc > 90	Severo

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](#)