

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JORDANA DE ABREU LAZZARINI

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICO DE *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)**

**JUIZ DE FORA
2015**

JORDANA DE ABREU LAZZARINI

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICO DE *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Magda Narciso Leite
Coorientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

JUIZ DE FORA

2015

JORDANA DE ABREU LAZZARINI

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICO DE *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 30/07/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Magda Narciso Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^a Dr^a Silvia Ribeiro de Souza (titular)
Universidade de Brasília - UNB

Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira (titular)
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

*"Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida."*

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas incríveis, com as quais tive a oportunidade de conviver e aprender durante estes dois anos, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À minha família, em especial ao meu pai, Alcélcio, que sempre me apoiou em todas as decisões. À minha mãe, Esther, que mesmo de longe, me acompanhou em cada etapa desta caminhada. Às minhas irmãs Sarita, Ravena e Amanda pelo amor incomparável.

À prof. Dr^a Magda, minha orientadora, a quem tenho imensa admiração pessoal e profissional, agradeço por cada ensinamento, experimento, convívio e amizade.

À prof. Dr^a Nádia, minha coorientadora, agradeço por gentilmente ter aberto as portas do NIQUA, oferecendo caminhos para dar continuidade a minha pesquisa.

À prof. Dr^a Fabíola, pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos em fitoquímica e pelas dicas durante a qualificação.

À amiga e companheira de projetos, Rebeca, agradeço por cada experimento, MEV e viagem que compartilhamos, foi fundamental a sua colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Às pessoas que dedicaram um pouco de seu tempo me ajudando nas diversas etapas deste estudo: Pedro, Carol e Bruna, na cultura de células; Hudson, pela ajuda com as análises estatísticas; César e Fran, na microbiologia; Aline, Thamis, Letícia, Tamires e Celinha na Farmacognosia.

Aos professores Dr. Ademar Alves e Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti, pela colaboração para o desenvolvimento das análises cromatográficas.

À Associação de Mulheres produtoras de Cataia, por ter cedido as folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

À prof. Dr^a Luciana Chedier, pela colaboração com informações botânicas sobre *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Aos companheiros do Nupics: Hudson, Rebeca, Priscila, Michele, Pedro, Hanny, Bruna, Fran, César, Carol e Alexandre pela convivência e amizade.

Aos amigos de turma: Luísa, Milene Minateli, Milene Evelyn, Fabrini, Rafael, Elisa e Lara, por terem tornado a caminhada mais leve e gostosa.

Aos membros da banca: Dr^a Silvia, Dr. Murilo, Dr. Hudson e Dr. Frederico, pela disponibilidade e colaboração.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente trabalho buscou caracterizar fitoquimicamente, avaliar o potencial antifúngico frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil; a atividade antioxidante e a citotoxicidade preliminar dos óleos essenciais adquiridos comercialmente (OCM) e obtido por extração no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (OEX) e do extrato hidroetanólico 95% (v/v), obtidos a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae). O *screening* fitoquímico realizado com o extrato hidroetanólico resultou na identificação de flavonoides, taninos e proantocianidinas. A quantificação destes metabólitos secundários na droga vegetal, por espectrofotometria UV-VIS, resultou em 18,77% de constituintes fenólicos totais, 10,69% de taninos e 0,52% de flavonoides. O perfil cromatográfico obtido por CG-EM do OEX indicou elevados teores de monoterpenos (48,83%) e fenilpropanoides (39,08%), tendo como constituinte majoritário o eugenol (34,38%). O OCM apresentou elevados teores de sesquiterpenos (25,64%) e fenilpropanoides (70,05%), e também apresentou o eugenol como constituinte majoritário (66,93%). Extrato e frações apresentaram notável atividade antioxidante pelo método de redução do DPPH, sugere-se que a mesma seja atribuída aos altos teores de compostos fenólicos, flavonoides e taninos encontrados. Promissores resultados de atividade antioxidante foram encontrados para os OEX e OCM, os quais possuem como constituinte majoritário o eugenol. Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas as seguintes linhagens fúngicas: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 e *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943 e duas linhagens clínicas de *Sporothrix schenckii*, denominadas genericamente como A e B. O OEX apresentou atividade antifúngica frente a todas as linhagens em concentrações que variaram de 260,46 a 520,90 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 520,90 $\mu\text{g/mL}$. O OCM foi capaz de inibir todas as linhagens em concentrações que variaram de 65,52 a 260,10 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 262,10 $\mu\text{g/mL}$. O eugenol apresentou atividade antifúngica frente a todas as linhagens em concentrações que variaram de 34,36 a 137,48 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 137,48 $\mu\text{g/mL}$. Ao ajustar os resultados de atividade antifúngica a 100% do constituinte majoritário eugenol, verificou-se a existência de sinergismo entre os constituintes do OEX, que apresentou maior atividade antifúngica (CIM=89,54 $\mu\text{g/mL}$) do que o eugenol (CIM=136,11 $\mu\text{g/mL}$) para quatro das seis linhagens estudadas. Foi observado que somente duas das linhagens estudadas apresentaram susceptibilidade à anfotericina B e três linhagens foram consideradas resistentes ao cetonazol com valores de CIM de 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao itraconazol, todas as linhagens estudadas foram consideradas resistentes, com valores de CIM > 128 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados sugerem indícios de resistência fúngica das linhagens estudadas em relação aos fármacos de referência empregados no tratamento da esporotricose. As eletromicrografias das linhagens fúngicas revelaram que, tanto nos fungos expostos aos tratamentos experimentais, quanto naqueles expostos aos fármacos de referência, pode-se observar deformidades na estrutura fúngica quando comparadas ao grupo não tratado. Em relação aos ensaios de citotoxicidade realizados com fibroblasto murino (L929) pelo método de redução do MTT, o extrato não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$), o eugenol não

apresentou citotoxicidade em concentrações menores ou igual a 125 $\mu\text{g/mL}$, o OCM não foi tóxico em concentrações menores ou igual a 250 $\mu\text{g/mL}$. Já em relação ao OEX concentrações inferiores ou igual a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram citotoxicidade.

Palavras-chave: Produtos naturais. *Pimenta pseudocaryophyllus*. Eugenol.

Esporotricose. Antioxidante. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The purpose of this work is to carry out the phytochemical study, evaluate the potential antifungal against the major strains causing sporotrichosis in Brazil, the antioxidant activity and the preliminary cytotoxicity of essential oils obtained commercially (CMO) and obtained by extraction in Pharmacognosy Laboratory of Pharmacy Faculty of the Federal University of Juiz de Fora (OEX) and hydroethanolic extract 95% (v/v), obtained from the leaves of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae). The phytochemical screening performed with the hydroethanolic extract resulted in the identification of flavonoids, tannins and proanthocyanidins. The quantification of these secondary metabolites in plant drug, by UV-VIS revealed the presence of phenolic constituents (18.77%), tannins (10.69%) and flavonoids (0.52%). The chromatographic profile obtained by GC-MS indicated the OEX high levels of monoterpenes (48.83%) and phenylpropanoids (39.08%) having as a major constituent eugenol (34.38%). The OCM had high levels of sesquiterpenes (25.64%) and phenylpropanoids (70.05%), with as major constituent eugenol (66.93%). Extract and fractions showed notable antioxidant activity by reduction of DPPH method, it is suggested that it be attributed to the high concentration of phenolic compounds, flavonoids and tannins found. Promising results of antioxidant activity were found for the OEX and OCM, which have as major constituent eugenol. For evaluating the antifungal activity the following fungal strains were used: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 and *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943 and two clinical strains, known generically as A and B. The OEX showed activity antifungal against all strains at concentrations ranging from 260.46 to 520.90 $\mu\text{g/mL}$. It was observed fungicidal activity against all strains at concentrations above 520.90 $\mu\text{g/mL}$. The OCM was able to inhibit all strains at concentrations ranging from 65.52 to 260.10 $\mu\text{g/mL}$. It was observed fungicidal activity against all strains at concentrations above 262.10 $\mu\text{g/mL}$. The eugenol showed antifungal activity against all strains at concentrations ranging from 34.36 to 137.48 $\mu\text{g/mL}$. It was observed fungicidal activity against all strains at concentrations above 137.48 $\mu\text{g/mL}$. By adjusting the results of antifungal activity to 100% of major constituent eugenol, it was found that there is synergy between the constituents of the OEX, with the highest antifungal activity (MIC = 89.54 $\mu\text{g/mL}$) than eugenol (MIC = 136.11 $\mu\text{g/mL}$) for four of the six strains studied. It was noted that only two of the studied strains were susceptible to amphotericin B and three strains were considered resistant cetonazol with MIC values of 4.0 $\mu\text{g/mL}$. Compared to itraconazole, all the strains studied were considered resistant with MIC values > 128 $\mu\text{g/mL}$. The micrographs revealed that the fungal strains in both fungi exposed to the experimental treatments, as those exposed to the reference drug, one can observe fungal deformities in structure when compared to the untreated group. In relation to the cytotoxicity assays performed with murine fibroblasts (L929) by the MTT reduction method, the extract showed no cytotoxicity at concentrations tested (10 to 100 $\mu\text{g/mL}$), eugenol showed no cytotoxicity at concentrations less than or equal to 125 $\mu\text{g/mL}$, OCM was not toxic at concentrations less than or equal to 250 $\mu\text{g/mL}$. In relation to the OEX concentrations below or equal to 62.5 $\mu\text{g/mL}$ showed no toxicity

Keywords: Natural products. *Pimenta pseudocaryophyllus*. Eugenol. Sporotrichosis. Antioxidant. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Rotas metabólicas de produção de metabólitos secundários nos vegetais.....	24
Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides.....	25
Figura 3. Representação esquemática simplificada da biossíntese do flavonoide hispidulina.....	27
Figura 4. Classes de flavonoides.....	28
Figura 5. Taninos hidrolisáveis.....	29
Figura 6. Taninos condensados.....	30
Figura 7. Biossíntese do eugenol.....	32
Figura 8. Formação de GPP a partir da condensação de DMPP e IPP.....	33
Figura 9. Formação de FPP a partir da condensação de GPP e IPP.....	33
Figura 10. Estruturas químicas do eugenol e citronelal.....	35
Figura 11. Estruturas moleculares de compostos encontrados em espécies vegetais do gênero <i>Pimenta</i>	36
Figura 12. <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> : A) Aspecto geral da planta, B) detalhe do tronco.....	37
Figura 13. <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> : A) Aspecto das flores, B) Aspectos das folhas e dos frutos.....	38
Figura 14. Distribuição de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> var. <i>pseudocaryophyllus</i> (preto), <i>P. pseudocaryophyllus</i> var. <i>fulvences</i> (verde) e <i>P. pseudocaryophyllus</i> var. <i>hoehnei</i> (vermelho).....	39
Figura 15. Bebida produzida pela Associação de Mulheres Produtoras de Cataia da Barra do Ararapira, ilha de Superagui, PR.....	40
Figura 16. Fontes exógenas e endógenas de produção de ERO e ERN.....	45
Figura 17. Esporotricose cutâneo localizada (A) e cutâneo linfática (B).....	48
Figura 18. Esporotricose cutâneo disseminada em humano (A) e felino (B).....	49

Figura 19. Chave de identificação das espécies de interesse clínico do complexo <i>S. Schenckii</i> proposta por marimon (2007).....	51
Figura 20. Colônia de <i>S. sckenckii</i> cultivado em ágar <i>Sabouraud</i> dextrose durante a sua fase filamentosa vista macroscopicamente (A) e microscopicamente (B).....	53
Figura 21. Colônia de <i>S. sckenckii</i> cultivado em ágar <i>Sabouraud</i> dextrose durante a sua fase leveduriforme vista macroscopicamente (A) e microscopicamente (B).....	54
Figura 22. Estrutura química da anfoterericina B.....	56
Figura 23. Representação esquemática da interação entre a anfotericina B e esteróis de membrana.....	57
Figura 24. Mecanismo de ação dos azóis.....	58
Figura 25. Estrutura química do cetoconazol.....	59
Figura 26. Estrutura química do itraconazol.....	60
Figura 27. Representação esquemática do procedimento realizado para a obtenção do extrato hidroetanólico 95% (v/v).....	65
Figura 28. Representação esquemática do procedimento realizado para a obtenção das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa.....	67
Figura 29. Desprotonação do ácido gálico em meio alcalino e posterior reação com o molibdênio presente no reagente de Folin Ciocalteu.....	72
Figura 30. Representação esquemática do procedimento realizado para a quantificação de fenóis totais na droga vegetal.....	74
Figura 31. Representação esquemática do procedimento realizado para a quantificação de fenóis não adsorvidos na droga vegetal.....	
Figura 32. Esquema representativo da complexação de flavonoides com o íon Al^{3+}	77
Figura 33. Representação esquemática do procedimento realizado para o deseamento de flavonoides na droga vegetal.....	79
Figura 34. Redução do radical DPPH.....	82
Figura 35. Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca microplaca.....	83

Figura 36. Redução do MTT a formazan.....	84
Figura 37. Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca.....	86
Figura 38. Esquema de microcultivo de lâmina em vidro.....	88
Figura 39. Esquema de preparo das soluções estoque de anfotericina B e cetoconazol.....	91
Figura 40. Esquema de preparo da solução estoque de itraconazol.....	91
Figura 41. Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca.....	92
Figura 42. Curva analítica obtida a partir de soluções de concentração conhecida do padrão de ácido gálico <i>versus</i> absorbância.....	97
Figura 43. Curva analítica obtida a partir de soluções de concentração conhecida do padrão de quercetina <i>versus</i> absorbância.....	99
Figura 44. Cromatograma do OEX, obtido por CG-EM.....	101
Figura 45. Estrutura química dos principais constituintes de OEX.....	103
Figura 46. Cromatograma do OCM obtido por CG-EM.....	104
Figura 47. Estrutura química dos principais constituintes do OCM.....	105
Figura 48. Espectro de massas obtido para o eugenol, a partir do OEX, por GC-EM.....	106
Figura 49. Espectro de massas obtido para o eugenol, a partir do OCM, por CG-EM.....	106
Figura 50. Proposta de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol.....	107
Figura 51. Imagem da colônia de <i>Sporothrix schenckii</i> cultivada em SDA.....	115
Figura 52. Microcultivo de <i>Sporothrix schenckii</i>	115
Figura 53. Eletromicrografias de <i>Sporothrix brasiliensis</i> IPEC 17943 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e aos fármacos de referência.....	125
Figura 54. Eletromicrografias de <i>S. schenckii</i> ATCC 1099-18 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e aos fármacos de referência.....	126

Figura 55. Viabilidade celular (L929) após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações das amostras..... 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medicamentos fitoterápicos disponibilizados pelo SUS...	19
Tabela 2. Medicamentos desenvolvidos a partir de espécies vegetais.....	20
Tabela 3. Adjuvantes farmacêuticos obtidos a partir de plantas.....	21
Tabela 4. Classificação dos compostos fenólicos conforme cadeia carbônica principal.....	25
Tabela 5. Faixa de teste das amostras e dos fármacos de referência utilizados no ensaio antifúngico.....	93
Tabela 6. <i>Screening</i> fitoquímico realizado com o extrato hidroetanólico 95% v/v das folhas de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	95
Tabela 7. Teor de polifenóis totais encontrados nas folhas de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	98
Tabela 8. Teor de tanino encontrado nas folhas de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	98
Tabela 9. Teores de flavonoides, equivalentes à quercetina, encontrados nas folhas de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	100
Tabela 10. Principais constituintes identificados e quantificados no OEX	102
Tabela 11. Constituintes identificados e quantificados no OCM	105
Tabela 12. Valores de atividade antioxidante, expressos em CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$, encontrados para as amostras e padrão	111
Tabela 13. Suscetibilidade <i>in vitro</i> das linhagens fúngicas frente ao OCM, OEX, eugenol e extrato etanólico de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	116
Tabela 14. Suscetibilidade <i>in vitro</i> das linhagens fúngicas frente ao OCM, OEX e eugenol ajustados a 100% de eugenol.....	119
Tabela 15. Suscetibilidade <i>in vitro</i> das linhagens fúngicas frente ao fármacos de referência itraconazol, anfotericina b e cetoconazol.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABD	Ágar batata dextrose
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (do inglês, Análise de Variância)
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
Cl ₅₀	Concentração de inibição em 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (do inglês, Instituto de Padroes clínicos e laboratoriais)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNH	Dihidroinaftaleno
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HEPES	Ácido [4-(2-hidróxi-1-etil)-1-piperazinaetanosulfônico]
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Preservação da Biodiversidade
IPP	Difosfato de isopentenila
IPEC	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IR _{CALC}	Índice de retenção calculado
IR _{LIT}	Índice de retenção da literatura
IS	Índice de similaridade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
MOPS	3-(N-morfolino) propano sulfônico
MEP	Metileritritol
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MVA	Mevalonato
m/z	Razão massa/carga

NCI	Instituto Nacional do Câncer dos EUA
OCM	Óleo essencial das folhas de <i>P. pseudocaryophyllus</i> obtido comercialmente
OEX	Óleo essencial das folhas de <i>P. pseudocaryophyllus</i> obtido por extração no laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Juiz de Fora
OMS	Organização Mundial da Saúde
RL	Radical livre
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SUS	Sistema Único de Saúde
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPCB	Herbário do Departamento de Botânica
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Importância de produtos vegetais no setor farmacêutico	18
2.2 Metabolismo vegetal.....	22
2.2.1 Compostos fenólicos	24
2.2.2 Flavonoides	25
2.2.3 Taninos.....	28
2.2.4 Óleos essenciais	30
2.3 Família Myrtaceae e gênero Pimenta	34
2.4 <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) L.R. Landrum	37
2.5 Radicais livres e estresse oxidativo.....	42
2.6 Antioxidantes	43
2.7 Infecções fúngicas.....	46
2.7.1 Esporotricose.....	47
2.7.2 Formas clínicas da esporotricose.....	48
2.7.3 Epidemiologia da doença	49
2.7.4 Fungos do complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	50
2.7.5 Farmacoterapia da esporotricose.....	55
3 OBJETIVOS	61
3.1 Geral	61
3.2 Específicos	61
4 MATERIAS E MÉTODOS	63
4.1 Equipamentos	63
4.2 Reagentes	64
4.3 Material vegetal	64
4.4 Obtenção do óleo essencial, extrato bruto e frações.....	64
4.5 <i>Screening</i> fitoquímico com o extrato bruto.....	67
4.5.1 Identificação de flavonoides	68
4.5.2 Identificação de taninos.....	68

4.5.3 Identificação de cumarinas.....	69
4.5.4 Identificação de saponinas.....	69
4.5.5 Identificação de alcaloides.....	70
4.5.6 Identificação de antraquinonas.....	70
4.5.7 Identificação de triterpenóides e esteróides.....	70
4.6 Determinação do teor de Polifenóis totais na droga vegetal.....	71
4.7 Determinação do teor de polifenóis não adsorvidos por caseína na droga vegetal.....	74
4.8 Determinação do teor de flavonoides totais expressos em quercetina na droga vegetal.....	76
4.9 Perfil cromatográfico do óleos essenciais de Pimenta pseudocaryophyllus.....	80
4.10 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	81
4.11 Avaliação da citotoxicidade.....	84
4.12 Ensaio antifúngico.....	86
Caracterização Macroscópica.....	87
Caracterização microscópica.....	87
4.13 Determinação da CIM e CFM.....	89
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	89
Padronização do inóculo fúngico.....	89
Preparo das amostras.....	90
Montagem da Microplaca.....	Error! Bookmark not defined.
Determinação da Concentração Fungicida (CFM).....	93
4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	93
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	95
5.1 Screening fitoquímico.....	95
5.2 Quantificação de fenois totais, taninos e flavonoides na droga vegetal..	97
5.1 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais.....	101
5.5 Atividade Antioxidante.....	111
5.6 Macro e micromorfologia, determinação da CIM e da CFM.....	114
5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	123
5.8 Citotoxicidade.....	127
6. CONCLUSÃO.....	130

REFERÊNCIAS..... 133

1 INTRODUÇÃO

Produtos originários da natureza, especialmente dos vegetais, são utilizados desde tempos imemoriais pelo homem para o tratamento de doenças. Nos tempos modernos, mesmo após o advento da química sintética, da química combinatória e dos *screenings* em alta escala, os produtos vegetais constituem fontes promissoras à descoberta de novos fármacos e à produção de medicamentos fitoterápicos.

No contexto dos produtos naturais, a família Myrtaceae pode representar uma fonte potencial à descoberta de novos fármacos e/ou ao desenvolvimento de fitoterápicos, visto que possui espécies com aplicações medicinais já estudadas e outras que, por possuírem atividade consagrada na cultura popular ou por terem sido estudadas em pesquisas científicas, fazem parte de Monografias da Farmacopéia Brasileira V.

Dentre os representantes de interesse medicinal desta família, destacam-se as espécies do gênero *Pimenta*. A única espécie do gênero no Brasil, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, conhecida popularmente como pau-cravo, louro-cravo, louro, craveiro, craveiro-do-mato, chá-de-bugre e cataia, ocorre na Mata Atlântica e, de forma rara, em regiões de Cerrado brasileiro. É utilizada na medicina popular para a produção de chás com propriedades calmante, diurética e afrodisíaca, bem como no tratamento de resfriado, problemas digestivos e menstruais. Estudos têm mostrado o potencial farmacológico *in vitro* desta espécie.

O aumento mundial da incidência de infecções fúngicas tem sido observado desde 1970. A esporotricose é uma micose subcutânea ocasionada por espécies de fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*, que afeta o homem e algumas espécies de animais. Durante as últimas décadas ocorreu um significativo aumento dos casos clínicos de esporotricose no Brasil, principalmente na região metropolitana do Rio de Janeiro, onde vem se manifestando uma epidemia em seres humanos correlacionada com a transmissão por felinos.

Entretanto, os avanços no tratamento das infecções fúngicas têm sido lentos. De acordo com Zacchino (2007), Vicente e Peláez (2007), estão disponíveis no mercado cinco classes de antifúngicos, todas com sérias desvantagens: algumas são tóxicas para o hospedeiro e pouco seletivas ao fungo, outras possuem limitado

espectro de ação e, ainda, há aquelas que são fungistáticas e não fungicidas, aumentando a possibilidade de recorrência da infecção.

Diante do quadro apresentado, há um consenso sobre a necessidade de pesquisas em torno de novas alternativas ao tratamento das infecções fúngicas. Neste sentido, muitos pesquisadores têm concentrado esforços em investigar as propriedades antimicrobianas de derivados vegetais.

As plantas medicinais também têm-se destacado em relação ao potencial antioxidante apresentado por diversas espécies, devido à presença de compostos com propriedades antioxidantes que fazem parte de seu metabolismo secundário. Neste grupo de constituintes, destacam-se os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Neste sentido, várias pesquisas têm sido conduzidas na busca de novos compostos com atividade antioxidante que tenham potencial para prevenir ou reverter o estresse oxidativo no organismo e, assim, atuar na cura e prevenção de uma série de doenças.

Em adição, estudos que visem à determinação dos aspectos toxicológicos de produtos de origem vegetal são de fundamental importância, para que, além da comprovação da eficácia do produto vegetal para determinada atividade farmacológica, possam ser também, comprovadamente seguros do ponto de vista toxicológico.

Neste contexto, o presente trabalho buscou caracterizar fitoquimicamente, avaliar o potencial antifúngico frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, a atividade antioxidante e a citotoxicidade preliminar dos óleos essenciais obtido comercialmente (OCM) e obtido por extração no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (OEX) e do extrato hidroetanólico 95% (v/v), obtidos a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância de produtos vegetais no setor farmacêutico

A utilização de produtos vegetais para a recuperação da saúde é um método terapêutico relacionado aos primórdios da medicina e fundamentado no acúmulo de informações por sucessivas gerações (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; PAULA *et al.*, 2010). Até por volta do século XIX, produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diferentes doenças (SAMY *et al.*, 2005; FOWLER, 2006; ASSIS *et al.*, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), ao considerar os produtos vegetais importantes instrumentos da assistência farmacêutica, expressa sua posição favorável a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização, ao estimar que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento depende deles no que se refere à Atenção Primária à Saúde (WHO, 1993; 2011).

No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos remonta de 1981 por meio da Portaria n.º 212, de 11 de setembro, do Ministério da Saúde, que, define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Desde então, várias políticas envolvendo plantas medicinais e fitoterápicos foram implantadas, destacando, mais recentemente, o decreto 5.813, de 22 de junho de 2006, com a instituição da Política Nacional de Plantas Medicinais, e a portaria 971 de 03 de maio de 2006, que insere a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Atualmente, estão inclusos na Relação Nacional de Medicamentos Essências (RENAME), doze medicamentos fitoterápicos que são instrumentos disponibilizados pelo SUS de grande relevância na assistência farmacêutica. Os medicamentos fitoterápicos constantes na RENAME encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Medicamentos fitoterápicos disponibilizados pelo SUS

Nome popular/Nome científico	Indicação/ação	Apresentação
Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.)	Tratamento dos sintomas de dispepsia funcional (síndrome do desconforto pós-prandial) e de hipercolesterolemia leve a moderada. Apresenta ação colagoga e colerética.	Cápsula, comprimido, drágea, solução oral e tintura
Aroeira (<i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>)	Cicatrizante, anti-inflamatória e anti-séptica tópica, para uso ginecológico	Gel e óvulo
Babosa (<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. F.)	Tratamento tópico de queimaduras de 1º e 2º grau e como coadjuvante nos casos de <i>Psoríase vulgaris</i>	Creme
Cáscara-sagrada (<i>Rhamnus purshiana</i> DC.)	Coadjuvante nos casos de obstipação intestinal eventual	Cápsula e tintura
Espinheira-santa (<i>Maytenus officinalis</i> Mabb.)	Coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal e sintomas dispepsia	Cápsula, emulsão, solução oral, tintura
Guaco (<i>Mikania glomerata Spreng.</i>)	Expectorante e broncodilatadora	Cápsula, solução oral, tintura e xarope
Garra-do-diabo (<i>Harpagophytum procumbens</i>)	Tratamento da dor lombar baixa aguda e como coadjuvante nos casos de osteoartrite. Ação anti-inflamatória	Cápsula, comprimido
Hortelã (<i>Mentha x piperita</i> L.)	Tratamento da síndrome do cólon irritável. Ação carminativa e antiespasmódica	Cápsula
Isoflavona-de-soja (<i>glycine max</i> (L.) Merr.)	Coadjuvante no alívio dos sintomas do climatério	Cápsula e comprimido
Plantago (<i>plantago ovata</i> Forssk.)	Coadjuvante nos casos de obstipação intestinal habitual. Tratamento da síndrome do cólon irritável	Pó para dispersão oral
Salgueiro (<i>Salix alba</i> L.)	Tratamento de dor lombar baixa aguda. Ação anti-inflamatória	Comprimido
Unha-de-gato (<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. Ex Roem. & Schult.)	Coadjuvante nos casos de artrite e osteoartrite. Ação anti-inflamatória e imunomoduladora	Cápsula, comprimido e gel

Fonte: RENAME, 2012

As plantas, além de serem fontes para a produção de medicamentos fitoterápicos, são também importantes fontes de desenvolvimento de compostos biologicamente ativos, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas, como fármacos ou como protótipos para a obtenção de fármacos, ou ainda, para a obtenção de adjuvantes farmacêuticos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003; ASSIS *et al.*, 2015).

Analisando os medicamentos disponibilizados no mercado mundial, estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais. No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, esta

porcentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2011; BRASIL, 2012). Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), entre 1940 e 2006, mais de dois terços das drogas anticâncer aprovadas, ou são produtos naturais, ou foram desenvolvidas com base neles (EFFERTH, 2010). Cabe ainda destacar que cerca de 50% de todos os novos componentes ativos de medicamentos colocados no mercado no período de 1º de janeiro de 1981 até 31 de dezembro de 2010 estão, direta ou indiretamente, relacionados aos produtos naturais, o que reflete a grande importância dos mesmos na produção de medicamentos (NEWMANN; CRAGG, 2012). Exemplos importantes de fármacos obtidos a partir de plantas encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Medicamentos desenvolvidos a partir de espécies vegetais

Fármacos	Classe terapêutica	Espécie vegetal
Artemisina	Antimalárico	<i>Artemisia annua L.</i>
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropina belladonna L.</i>
Capsaicina	Anestésico tópico	<i>Capsicum spp.</i>
Colchicina	Antirreumático	<i>Colchicum autumnale L.</i>
Escopolamina	Antiparkinsoniano	<i>Datura spp.</i>
Fisostignina	Antiglaucomatoso	<i>Physostigma venenosum balf</i>
Morfina, codeína	Analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum L</i>
Pilocarpina	Antiglaucomatoso	<i>Pilocarpus jaborandi Holmes</i>
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona spp.</i>
Reserpina	Anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia spp.</i>
Tubocurarina	Bloqueador neuromuscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Vimblastina, vincristina	Antitumorais	<i>Catharantus roseus G. Don.</i>
Camptotecina	Antitumorais	<i>Camptotheca Nacuminata Decne.</i>
Paclitaxel	Antitumorais	<i>Taxus baccata L. e Taxus brevifolia Nutt</i>

Fonte: Adaptado de SCHENKEL *et al.*, 2002

Além de fonte de fabricação de fármacos e medicamentos fitoterápicos, grande parte dos adjuvantes farmacêuticos empregados atualmente na produção de

medicamentos, também são de origem vegetal (Tabela 3).

Tabela 3. Adjuvantes farmacêuticos obtidos a partir de plantas

Adjuvante	Função principal	Fonte vegetal
Amido e derivados	Aglutinante e desagregante	<i>Zea mays L.</i> <i>Solanum tuberosos L.</i>
Celulose e derivados	Aglutinante, desagregante, formador de gel, espessante, filmógeno, modificador de cedência	<i>Pinnus spp.</i> <i>Eucaliptus spp.</i>
Óleos vegetais	Adequadores e corretivos organolépticos	<i>Citrus spp.</i> <i>Mentha spp.</i>
Cera de carnaúba	Excipiente das formas farmacêuticas semi-sólidas	<i>Corpernicia prunifera (Miller)</i>
Esteveosídeo	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana Hemsl.</i>
Pectina	Aglutinante, formador de gel, espessante	<i>Cytrus spp.</i>
Manteiga de Cacau	Base de supositórios	<i>Theobroma cacao L.</i>
Etanol	Veículo	<i>Saccharum officinarum L.</i>

Fonte: SCHENKEL *et al.*, 2002

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento desta terapêutica. A grande extensão territorial do país, com uma enorme diversidade de climas e solos, favorece a biodiversidade e a diversidade química. Determinadas áreas como a floresta Amazônica e Atlântica, o Cerrado e a Caatinga são ricos em espécies que podem fornecer compostos naturais ativos para uma variedade de enfermidades (SAMY *et al.*, 2005; BIAVATTI *et al.*, 2007; PAULA *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2015). Entretanto, apesar de toda a diversidade de espécies existentes, o potencial de uso de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado.

Entre as 250 mil a 500 mil espécies de plantas estimadas no mundo, apenas uma pequena parcela tem sido investigada fitoquimicamente, fato que ocorre também em relação às propriedades farmacológicas, nas quais, em muitos casos, existem apenas estudos preliminares. No Brasil, com cerca de 55 mil espécies de plantas, há relatos de investigação de apenas 0,4% da flora (BRASIL, 2012).

Apesar da rica biodiversidade, dentre os fitoterápicos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), uma pequena parte é oriunda de espécies nativas, o que demonstra a necessidade de investimentos em pesquisas com espécies da flora nacional (MIOTO, 2010). Além disso, paradoxalmente ao potencial e oportunidades que oferece, o Brasil representa o décimo mercado farmacêutico mundial e importa cerca de 100% de matéria-prima utilizada na produção de medicamentos fitoterápicos (ADAME; JACCOUD; COBRA, 2005; BRASIL, 2012).

Nesse sentido, faz-se necessário pesquisas com a flora nacional para a busca de novos medicamentos a serem utilizados no tratamento de diversas enfermidades, visto que, os produtos naturais, sejam substâncias isoladas, extratos vegetais ou óleos essenciais, podem fornecer oportunidades ilimitadas para o desenvolvimento de novos medicamento devido a incomparável diversidade química (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; TASLEEM *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2015).

2.2 Metabolismo vegetal

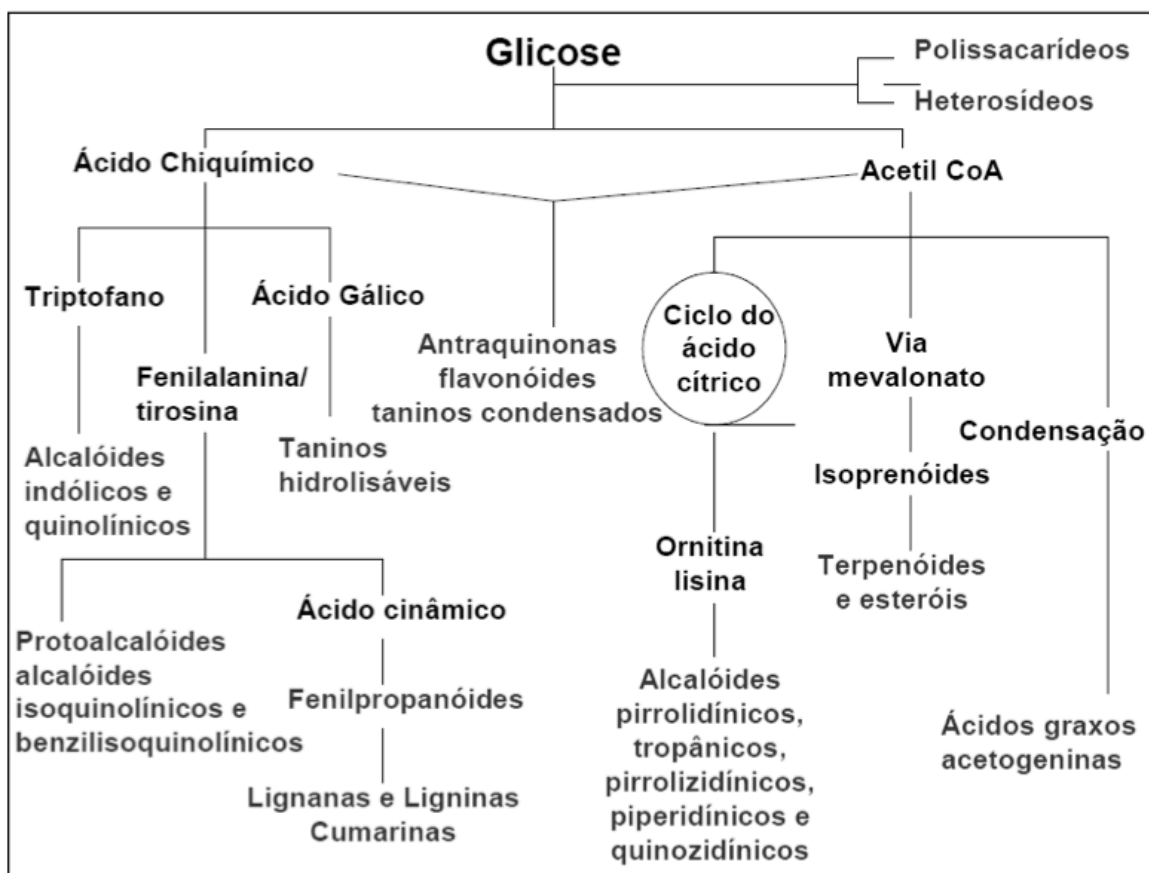
Os constituintes químicos encontrados no Reino Vegetal são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas. A produção de compostos essenciais à sobrevivência das espécies vegetais, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, fazem parte do metabolismo primário. Por outro lado, micromoléculas com estruturas complexas, baixo peso molecular, originadas à custa de gasto energético, através de rotas biossintéticas diversas, fazem parte do metabolismo secundário (XYNOS *et al.*, 2012). Tais compostos, são encontrados apenas em organismos específicos e são uma expressão da individualidade das espécies (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da espécie ao meio ambiente. Desse modo, as rotas metabólicas que os origina, provavelmente, só são ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento, ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ainda, pelo ataque de herbívoros ou micro-organismos patogênicos. Isto explica o fato de os metabólitos secundários não estarem uniformemente distribuídos pela planta (LEITAO, *et al.*, 2001). Além

disso, a composição química e a concentração destes compostos podem variar a depender dos fatores ambientais e ecológicos, das condições edafoclimáticas, da sazonalidade e até mesmo por interferência do ritmo circadiano (LIMA *et al.*, 2007).

A origem de todos os constituintes do metabolismo secundário presentes em plantas pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, por intermédio de quatro precursores principais: coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-deoxixilulose 5-fosfato, sendo coordenado por uma série de enzimas e co-enzimas responsáveis pelos processos de síntese e degradação das substâncias que estarão, diferentemente, distribuídas nas diversas espécies de plantas (Figura 1) (SIMOES *et al.*, 2007; DEWICK, 2009).

Figura 1. Rotas metabólicas de produção de metabólitos secundários nos vegetais



Fonte: adaptado de SIMOES *et al.*, 2007

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas que apresentam como estrutura básica um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Trata-se de um grupo com aproximadamente 10.000 compostos já conhecidos e de grande importância do ponto de vista farmacológico. No vegetal, os compostos fenólicos exercem função estrutural em tecidos de suporte e de proteção; estão envolvidos em estratégias de defesa contra micro-organismos e predadores; em interações entre plantas e ambiente; podem agir como atrativo para polinização, por contribuírem para a pigmentação do vegetal; além disso, apresentam propriedades de óxido-redução atuando na absorção e neutralização de radicais livres, pois possuem elétrons π em sua estrutura que estabilizam o radical formado pela oxidação do fenol (CORREIA *et al.*, 2012; CHIRINOS *et al.*, 2013).

Devido à grande diversidade estrutural dos compostos fenólicos, eles podem ser classificados de acordo com a cadeia carbônica principal (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos compostos fenólicos conforme cadeia carbônica principal

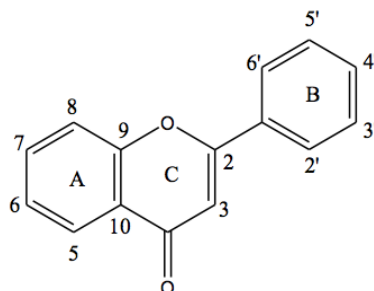
ESTRUTURA	CLASSE
C_6	Fenóis
$C_6 - C_1$	Ácidos hidroxibenzóicos
$C_6 - C_3$	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
$C_6 - C_4$	Naftoquinonas
$C_6 - C_1 - C_6$	Benzofenonas e xantonas
$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbenzenos e antraquinonas
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides: flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavonas
$(C_6 - C_2 - C_6)_2$	Biflavonóides
$(C_6 - C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos condensados ou proanticianidinas

Fonte: LEMOS, 2008

2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são uma importante classe de compostos fenólicos formados por quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado central C, acoplado ao anel A (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides



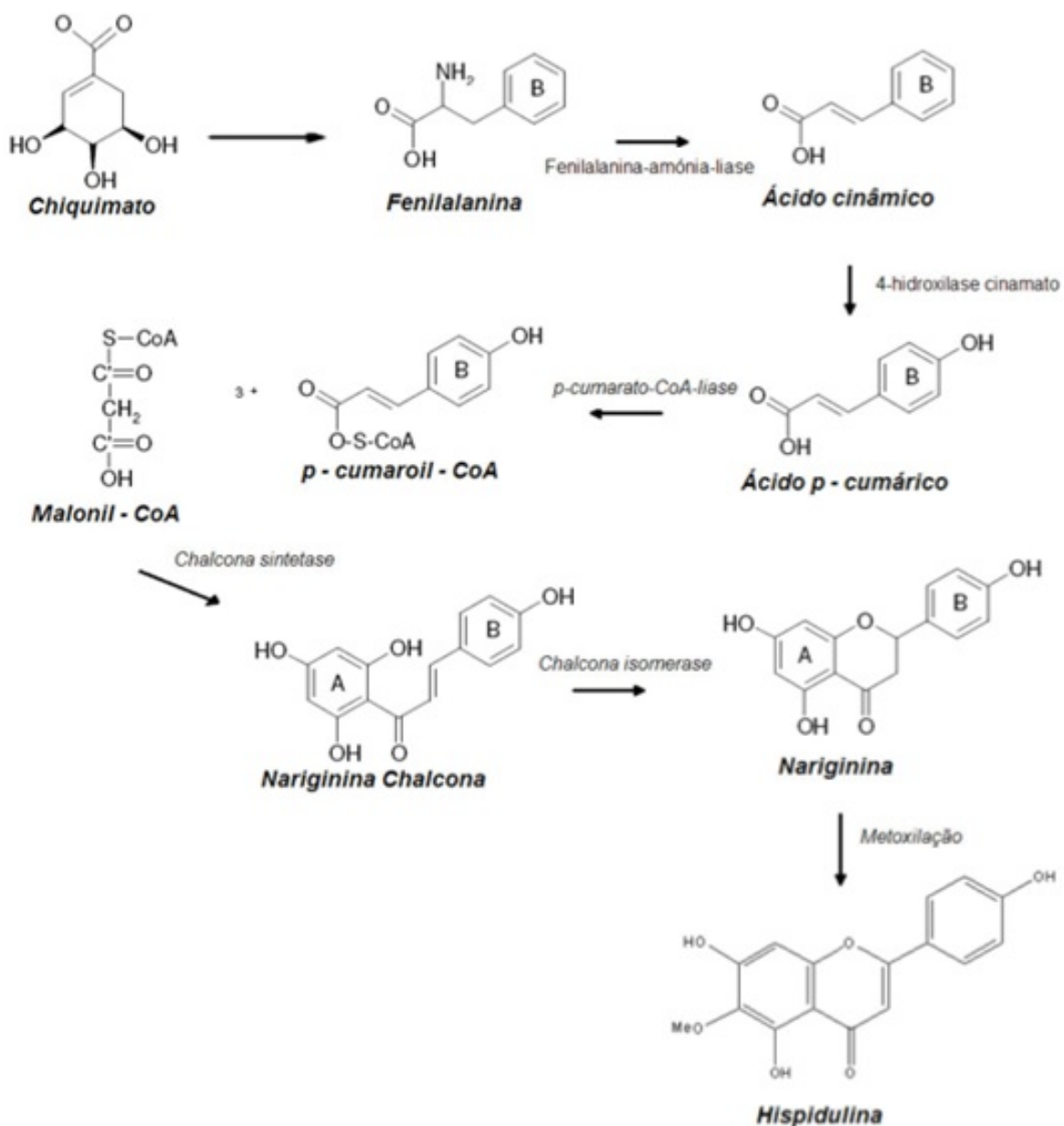
Fonte: MARQUES, 2008

A biossíntese dos flavonoides ocorre por uma via mista, a via do ácido

chiquímico e a do acetato. O ácido chiquímico é o precursor do composto inicial da síntese dos flavonóides, a fenilalanina. Este aminoácido aromático depois de desaminado pela fenilalanina-amônia-líase (PAL) produz o ácido cinâmico, que por ação da 4-hidroxilase cinamato é convertido em ácido *p*-cumárico. Estas duas enzimas estão associadas, o ácido cinâmico é transferido diretamente para o centro ativo da segunda enzima (MARQUES, 2008).

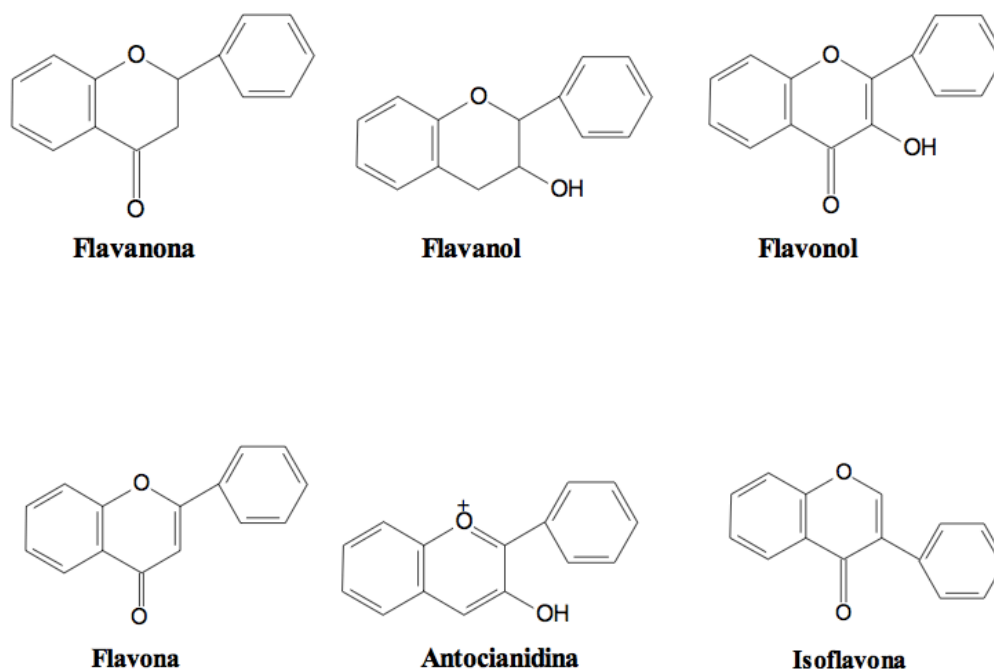
Posteriormente, ocorre a adição da CoA, catalisada pelo *p*-cumarato-CoA liase, originando a *p*-cumaroil-CoA, que ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a chalcona. Esta reação é catalizada pela chalcona sintetase. Finalmente, ocorre a ciclização do anel C, catalizada pela chalcona isomerase, para formar flavonoide, por meio de metoxilação. Desta forma, nos flavonoides, o anel A é formado via acetato, enquanto o B resulta da via chiquimato e os três átomos de carbono que ligam o anel A ao B derivam do fosfoenolpiruvato (MARQUES, 2008; DEWICK, 2009). Na Figura 3 está representada a biossíntese do flavonoide hispidulina.

Figura 3. Representação esquemática simplificada da biossíntese do flavonoide hispidulina



Fonte: MARQUES, 2008

Conforme o estado de oxidação e insaturação do anel C, têm-se diferentes classes de flavonoides: antocianinas, flavanóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis (Figura 4).

Figura 4. Classes de flavonoides

Fonte: LIMA *et al.*, 2012

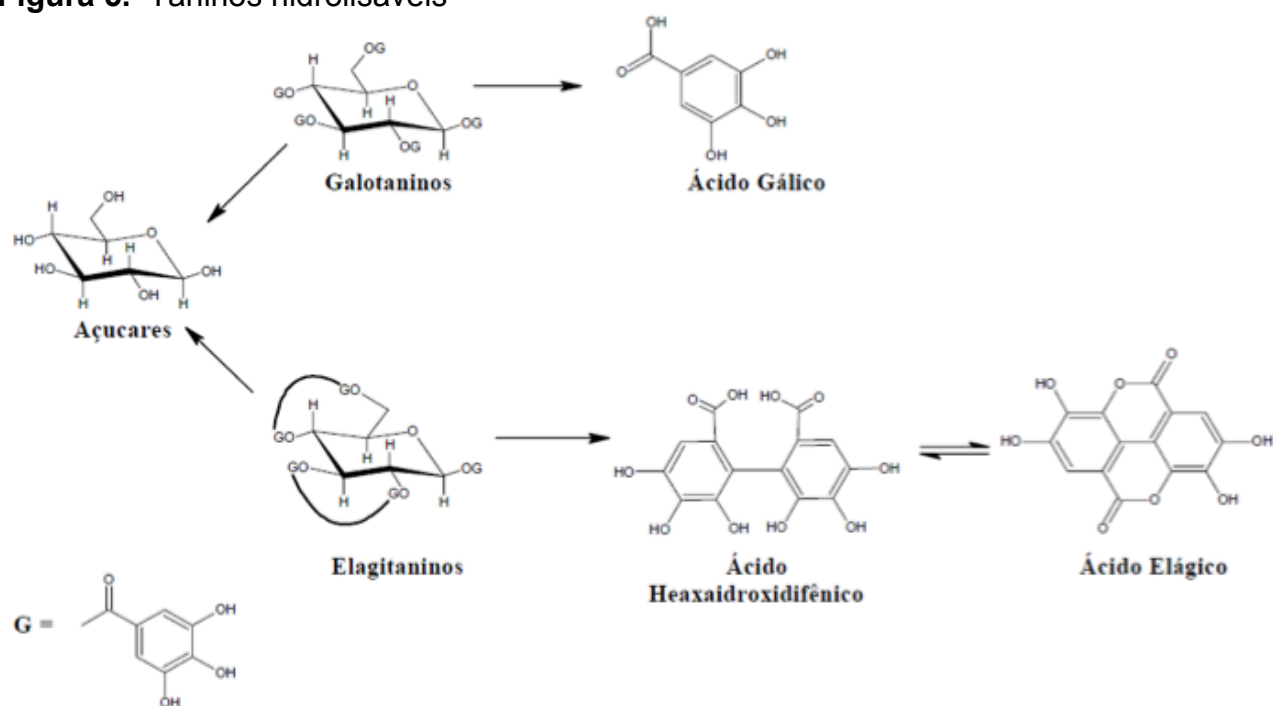
Nas plantas os flavonoides desempenham diversas funções, entre elas, proteção contra radiação ultravioleta B (os pigmentos formados pelos flavonoides atuam como absorventes da radiação UVB agindo como filtro e evitando que a radiação incida sobre outras moléculas celulares como o DNA) e produção de fitoalexinas contra ataques microbianos (LIMA *et al.*, 2012).

2.2.3 Taninos

Os taninos também pertencem ao grupo de compostos fenólicos, encontrados na forma de ésteres ou de heterosídeos, são responsáveis pelo sabor adstringente de algumas frutas e produtos vegetais, em razão da precipitação de glicoproteínas salivares, que ocasiona a perda do poder lubrificante da saliva. São compostos reativos quimicamente e formam ligação de hidrogênio intra e intermoleculares. Podem ser identificados em extratos vegetais por meio da precipitação de proteínas e pela oxidação por influência de metais como o cloreto férrico que provoca o escurecimento da solução (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os taninos são classificados de acordo com a sua estrutura química em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os hidrolisáveis (Figura 5) são ésteres de ácidos gálico e elágico glicosilados, obtidos pela rota do chiquimato em que o grupo hidroxila do açúcar é esterificado com os ácidos fenólicos. Os ésteres do ácido hexaidroxidifênico são formados pelo acoplamento oxidativo fenólico de funções galoil catalisados pela enzima tipo lacase oxidase fenol (DEWICK, 2009).

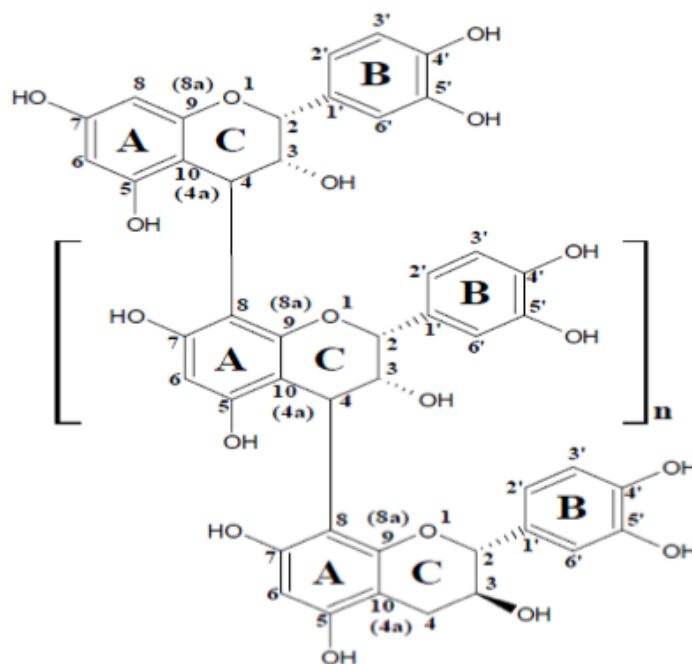
Figura 5. Taninos hidrolisáveis



Fonte: DÔRES, 2007

Os taninos condensados (Figura 6) consistem em polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol. (MONTEIRO *et al.*, 2005; DÔRES, 2007; LEMOS, 2008).

Figura 6. Taninos condensados



Fonte: SILVA *et al.*, 2010

Os taninos estão envolvidos no mecanismo de defesa das plantas contra ataques de fungos, bactérias, vírus, insetos e herbívoros. Ao sofrer ataque dos fitófagos, a planta libera substâncias de sabor amargo ou adstringente ao paladar dos animais, fato que pode ser explicado pela característica dos taninos de se associarem às glicoproteínas salivares (SILVA *et al.*, 2010). Além deste fato, eles aumentam o tempo de vida da planta no solo, pois proporcionam um aumento no estoque de nutrientes da planta para o próximo período de vegetação, protegendo-a contra infertilidade do solo e seca (NOZELLA, 2001).

2.2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis originados do metabolismo secundário das plantas, constituídos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides e outras substâncias de baixa massa molecular, formando misturas complexas de substâncias voláteis odoríferas e líquidas. (CAVALEIRO *et al.*, 2015). A principal característica desses óleos essenciais é a volatilidade e isso os diferencia dos óleos fixos, os quais são formados por ácidos monocarboxílicos de cadeia longa saturada ou insaturada. (GARCIA *et al.*, 2012).

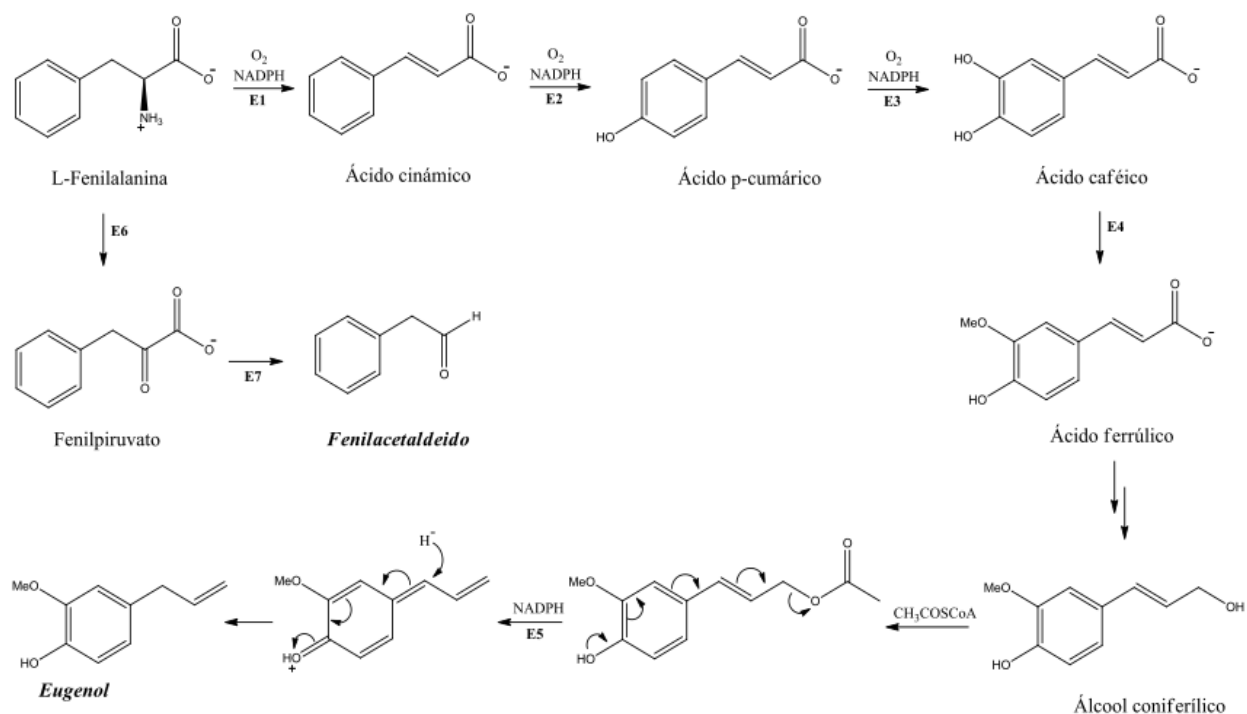
Podem ser encontrados nas folhas, flores, cascas, madeira, raízes, frutos e sementes. Na natureza estão relacionados a diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos e outros predadores, atuando como inibidores de germinação, na proteção contra a perda de água, aumento da temperatura, além de estarem envolvidos na atração de polinizadores e atuarem contra herbívoros (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2015).

Os compostos voláteis encontrados em óleos essenciais podem ser divididos em três grupos principais: fenilpropanóides; hidrocarbonetos oxigenados de cadeia curta (aldeídos, cetonas, ésteres, dentre outros); e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos e, menos frequente, diterpenos) (DUDAREVA *et al.*, 2004).

Hidrocarbonetos oxigenados de cadeia curta (não derivados de isoprenóides) é o grupo menos abundante de voláteis encontrados em óleos essenciais e são derivados da clivagem oxidativa e descarboxilação de vários ácidos graxos (FONSECA *et al.*, 2015).

Compostos contendo um anel aromático representam o segundo maior grupo de voláteis encontrados em óleos essenciais, com destaque para os fenilpropanóides. Os fenilpropanóides são compostos aromáticos que derivam da rota que se inicia com a formação do ácido chiquímico. Este é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato que, por sua vez formam a fenilalanina e a tirosina; pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), estas perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico, que apresentam em sua estrutura uma cadeia lateral que contém três átomos de carbono ligados ao anel aromático. Finalmente, por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, os ácidos cinâmico e p-cumárico levam à formação de fenilpropanóides (SIMOES *et al.*, 2007). Dentre os fenilpropanóides, destaca-se o eugenol, descrito como componente majoritário de *P. pseudocaryophyllus* por alguns autores (LIMA *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2010). Na Figura 7 está representada a biossíntese do eugenol.

Figura 7. Biossíntese do eugenol



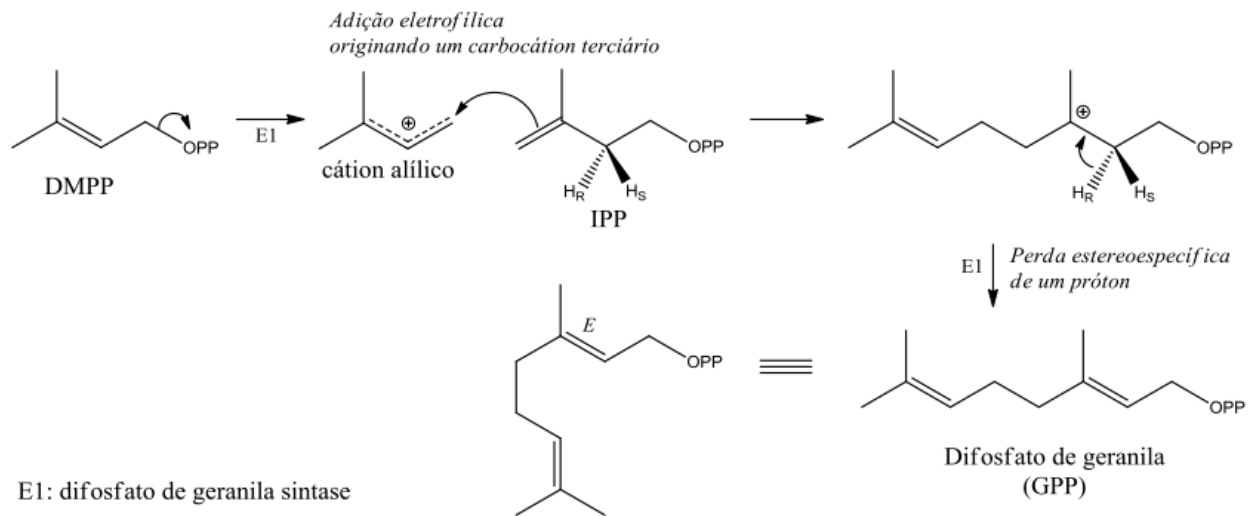
E1: Fenilalanina amônia-liase; E2: Cinamato 4-hidroxilase; E3: p-Cumarato 3-hidroxilase; E4: Ácido caferílico O-metiltransferase; E5: Eugenol sintase 1; E6: Transaminase; E7: Fenilpiruvato descarboxilase.

Fonte: Adaptado de DEWIK, 2009

A classe mais abundante de compostos presente nos óleos essenciais são os terpenos, com destaque para os monoterpenos que constituem mais de 90% de uma grande variedade de óleos essenciais conhecidos (BAKKALI *et al.*, 2008). A biossíntese de terpenos pode acontecer por dois caminhos diferentes: o caminho do mevalonato (MVA) no citoplasma das células e o caminho do metileritritol (MEP) nos plastídeos das células. Os precursores formados nestes caminhos são dois isômeros, o difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) que por condensações tipo Claisen e aldólica formam os terpenos (CROTEAU, 2000).

O difosfato de geranila, com dez átomos de carbono em sua estrutura, é o precursor dos monoterpenos e forma-se a partir da condensação do tipo cabeça-cauda de uma molécula de IPP com uma molécula de DMAPP (Figura 8) (DEWICK, 2009).

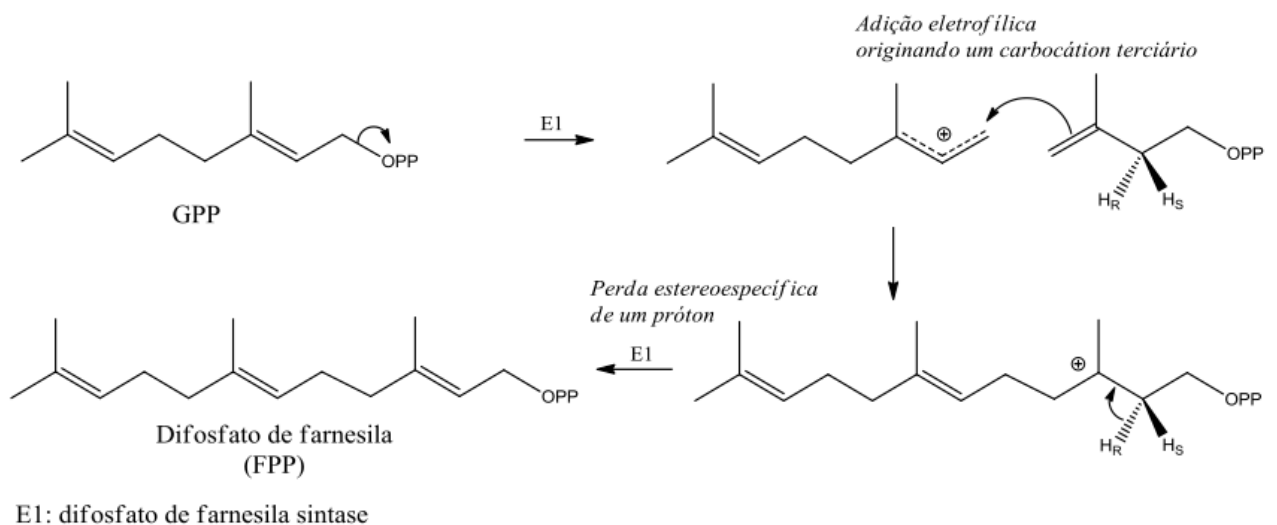
Figura 8. Formação de GPP a partir da condensação de DMPP e IPP



Fonte: Adaptado de DEWIK, 2009

Uma segunda condensação, entre o GPP e uma molécula de IPP, fornece o precursor dos sesquiterpenos, o difosfato de farnesila (FPP), como consequência, todos os sesquiterpenos possuirão quinze átomos de carbono em sua estrutura (Figura 9). Diferentemente da síntese dos monoterpenos que ocorre nos plastídeos das células através da via do MEP, os sesquiterpenos formam-se no citoplasma das células através da via do MVA (PICHESKY *et al.*, 2006).

Figura 9. Formação de FPP a partir da condensação de GPP e IPP



Fonte: Adaptado de DEWIK, 2009

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados pelas indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosmética, agrícola e de alimentos devido às suas ações bactericida, fungicida, parasiticida, inseticida e virucida, além de outras propriedades medicinais (MILLEZI, 2012). O Brasil ocupa lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se, principalmente, aos óleos essenciais de bergamota, limão, tangerina, laranja e outros cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos (BIZZO *et al.*, 2009).

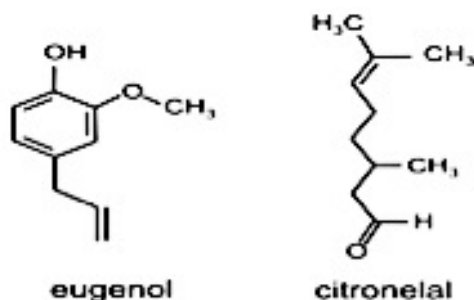
2.3 Família Myrtaceae e gênero Pimenta

As espécies pertencentes à família Myrtaceae ocorrem amplamente em todo o mundo, com distribuição preferencial nas zonas tropicais e subtropicais (PAULA *et al.*, 2010). É uma das famílias mais importantes e dominantes da flora brasileira, especialmente na Mata Atlântica, sendo composta por cerca de 4000 espécies distribuídas em aproximadamente 130 gêneros. No Brasil, são encontrados 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; PAULA *et al.*, 2011).

As espécies pertencentes a esta família apresentam-se na forma de árvores ou arbustos. Na Mata Atlântica, destaca-se entre as famílias com grande potencial econômico a ser explorado, pois há numerosas espécies frutíferas, algumas comercialmente importantes, como a goiabeira (*Psidium guajava*), a jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Outra característica importante da família Myrtaceae é a produção de óleos essenciais (PAULA *et al.*, 2010). Muitas espécies são exploradas economicamente em função de seus óleos voláteis, como vários representantes do gênero *Eucalyptus* que produzem monoterpênicos como o citronelal (Figura 10), com propriedades antissépticas, e o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que produz o fenilpropanóide eugenol (Figura 10), com propriedades antimicrobianas e anestésicas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Figura 10. Estruturas químicas do eugenol e citronelal



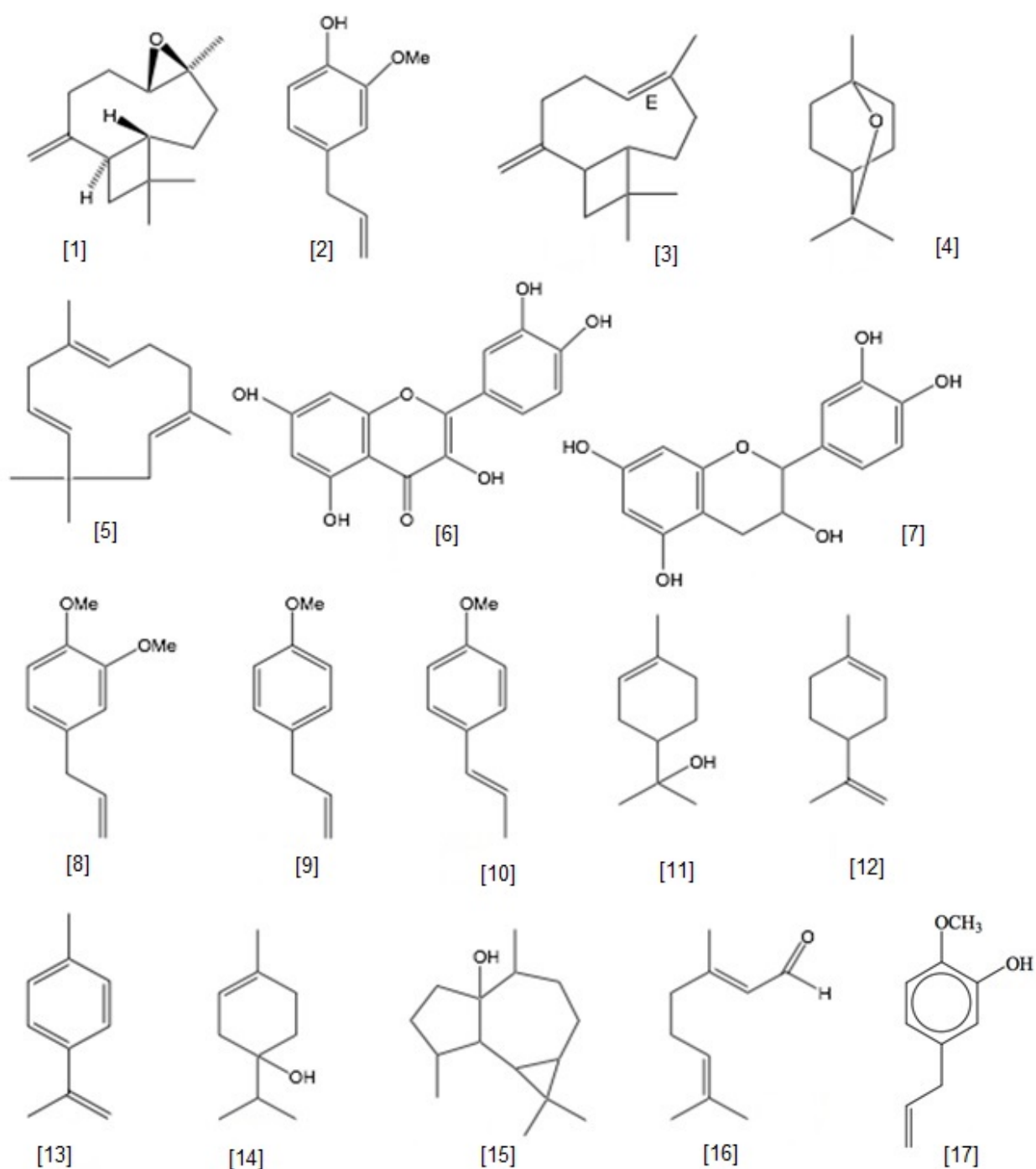
Fonte: LIMA *et al.*, 2006

Dentre os representantes de interesse medicinal dessa família destacam-se as espécies do gênero *Pimenta*. Segundo Landrum (1986) e Landrum e Kawasaki (1997), as espécies do gênero *Pimenta* são, na maioria, arbóreas e podem crescer até 20 metros. Algumas espécies podem apresentar-se como arbustos. A maioria das espécies é nativa do Caribe e América Central exceto uma delas, *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, que é nativa do Brasil e encontrada nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; PAULA *et al.*, 2011).

O grupo de metabólitos de interesse medicinal encontrado com maior frequência no gênero *Pimenta* é o dos óleos essenciais (LIMA *et al.*, 2006). Tal característica tem levado pesquisadores a se dedicarem em estudos de identificação e quantificação dos componentes de óleos essenciais de espécies desse gênero. Porém, outros metabólitos secundários também têm sido descritos, tais como saponinas, flavonoides e taninos (PAULA *et al.*, 2008; RIBEIRO, 2013).

Em estudo realizado por Paula e colaboradores (2011) verificou-se que os componentes majoritários dos óleos essenciais de espécies do gênero *Pimenta* são, na maioria, derivados fenilpropanóides e monoterpenos (Figura 11) (PAULA *et al.*, 2011).

Figura 11. Estruturas moleculares de compostos encontrados em espécies vegetais do gênero *Pimenta*



[1] óxido de cariofileno. [2] eugenol. [3] β -cariofileno. [4] 1,8-cineol. [5] α -humuleno. [6] quercetina. [7] catequina. [8] metileugenol. [9] metil chavibetol. [10] anetol. [11] α -terpineol. [12] limoneno. [13] p-cimeno. [14] terpinen-4-ol. [15] palustrol. [16] geraniol. [17] chavibetol.

Fonte: adaptado de PAULA, 2011

Algumas atividades farmacológicas já foram estudadas para o gênero *Pimenta*. *P. dioica* (L.) Merrill possui atividade analgésica e antipirética. Seu efeito analgésico foi atribuído à inibição de síntese de prostaglandinas, devido à presença de eugenol (ROMERO *et al.*, 2005; OUSSALAH *et al.*, 2006). *P. racemosa* (P. Miller) J.W. Moore é uma planta nativa das ilhas do Caribe, utilizada na medicina popular para o tratamento de diferentes doenças, como dor de dente, dor abdominal, febre, gripe, reumatismo e pneumonia. García e colaboradores (2004) e Fernández e colaboradores (2001) relataram atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas desta espécie.

2.4 *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum

Esta espécie é popularmente conhecida como pau-cravo, craveiro, louro-cravo, craveiro-do-mato, chá-de-bugre e cravo, ocorre na Mata Atlântica e em regiões do Cerrado brasileiro (NAKAOKA-SAKITA *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2011; CAMPANINI *et al.*, 2013). Possui altura aproximada de 4 metros e em certas regiões pode ocorrer como simples arbusto. Apresenta tronco ereto com casca áspera e fissurada (Figura 12) (SANTOS *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2010).

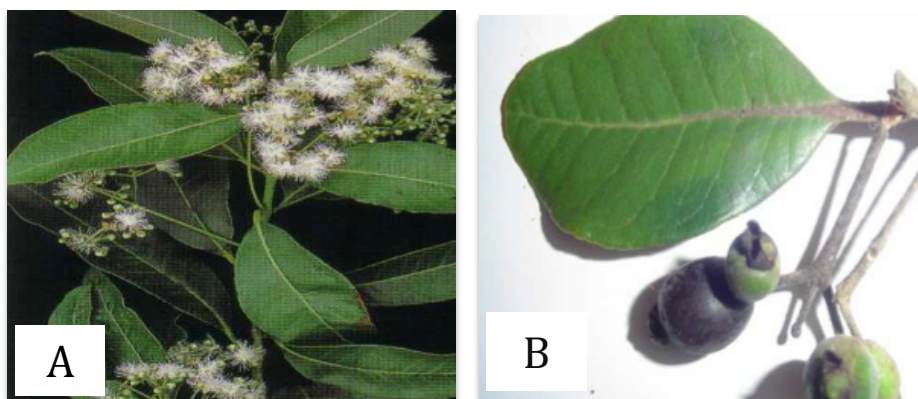
Figura 12. *Pimenta pseudocaryophyllus*: A) Aspecto geral da planta, B) detalhe do tronco



Fonte: PAULA, 2006

As inflorescências apresentam-se em panícula ou dicásios, de coloração branca e muito perfumadas (Figura 13 A). Apresenta frutos do tipo baga subglobosa, de polpa succulenta, contendo uma a duas sementes muito duras. Os frutos, quando maduros, adquirem uma coloração muito escura, quase negra (Figura 13 B). As folhas são elípticas, obovadas ou elíptico-lanceolada, densamente cobertas por longos pêlos unicelulares na face inferior e glabra na face superior (Figura 13 B) (FARIAS *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2010; CUSTÓDIO *et al.*, 2013).

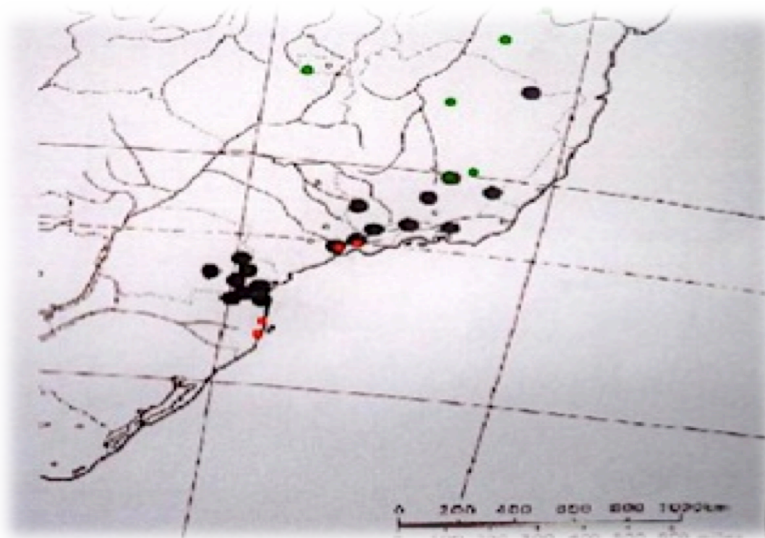
Figura 13. *Pimenta pseudocaryophyllus*: A) Aspecto das flores, B) Aspectos das folhas e dos frutos



Fonte: SANTOS, 2009

P. pseudocaryophyllus ocorre em três variedades regionais. A *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum é árvore de pequeno porte típica de florestas e áreas montanhosas do sudeste e sul do Brasil; a *P. pseudocaryophyllus* var. *fulvescens* DC. Landrum é uma pequena árvore ou arbusto que se localiza em regiões secas no centro sul do Brasil e existem alguns exemplares na Bolívia; e a *P. pseudocaryophyllus* var. *hoehnei* (Burret) Landrum é pequena árvore confinada na região florestal litorânea do sul e do sudeste do Brasil, de Santa Catarina a São Paulo (Figura 14) (BRANDÃO, 2002; PAULA *et al.*, 2010; FERNADES *et al.*, 2012).

Figura 14. Distribuição de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (preto), *P. pseudocaryophyllus* var. *fulvences* (verde) e *P. pseudocaryophyllus* var. *hoehnei* (vermelho)



Fonte: LANDRUM, 1986

Na medicina popular brasileira, as folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* têm sido utilizadas em diferentes preparações. Em São Gonçalo do Abaeté-MG, são utilizadas para fazer chá contra gripe (PAULA *et al.*, 2008). No município de Campos do Jordão-SP, as folhas são usadas para fazer chá calmante, bem como para tratar problemas de má digestão e desordens de menstruação (NAKAOKA SAKITA, *et al.*, 1994; FAJEMIROYE *et al.*, 2012;). Na região do Vale do Ribeira-SP tem sido utilizada no combate a gripes, resfriados e fadiga (LIMA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009).

Além da utilização para fins medicinais, as folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* têm sido utilizadas como condimento em alimentos, tais como feijão, carnes, ensopados, doces, geléias e como aromatizante em aguardente, bebida denominada “cataia” (Figura 15), de importância notável no litoral do estado do Paraná e São Paulo. Esta bebida é produzida pela Associação das Mulheres Produtoras de Cataia da Barra do Arapirã- PR. Tal associação surgiu da iniciativa do Serviço Florestal Brasileiro com a participação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO), pois a área de coleta da planta está inserida em uma Unidade de Conservação, o Parque Nacional de Superagui, no Paraná (CATENACCI, 2010).

Figura 15. Bebida produzida pela Associação das Mulheres Produtoras de Cataia da Barra do Ararapira, ilha de Superagui, PR



Fonte: CATENACCI, 2010

Com o intuito de justificar o seu uso popular como agente tranquilizante um estudo desenvolvido por Fajemiroye e colaboradores (2012) buscou caracterizar o efeito ansiolítico do extrato etanólico da folha de *P. pseudocaryophyllus* e identificar os mecanismos de ação envolvidos. Os resultados demonstraram que a fração diclorometano do extrato etanólico das folhas de *P. pseudocaryophyllus* possui substâncias com ação ansiolítica envolvendo o receptor 5-HT_{1A}, sem qualquer interferência com a coordenação motora, justificando, dessa maneira, o uso popular como um agente calmante (FAJEMIROYE *et al.*, 2012).

Paula e colaboradores (2012) avaliaram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico bruto, frações e substâncias semipurificadas deste, e de óleos essenciais obtidos a partir de folhas de dois quimiotipos mais frequentemente encontrados na região de coleta (São Gonçalo do Abaeté-MG), o quimiotipo (E)-metil isoeugenol e o quimiotipo citral. A atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foi avaliada pelos testes de edema de orelha induzido por óleo de Croton e teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético, respectivamente. O extrato etanólico bruto do quimiotipo citral mostrou efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo, o que, segundo os autores, pode estar relacionado à presença de triterpenos pentacíclicos lupeol, α -amirina, e β -amirina e os flavonóides quercetina, quercitrina, e afzelina.

Em relação a ação antimicrobiana de *P. Pseudocaryophyllus*, alguns

estudos envolvendo fungos e bactérias de relevância clínica foram desenvolvidos e têm mostrado o potencial antimicrobiano *in vitro* desta espécie (LIMA *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2012; PAULA *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de espécimes de *P. pseudocaryophyllus*, coletadas em dois locais no Estado de São Paulo (Ilha do Cardoso e Paranapiacaba), foi determinada por Lima e colaboradores (2006). Os melhores resultados contra a *Escherichia coli* foram obtidos com a espécime coletado na Ilha do Cardoso, enquanto contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, ambas as amostras apresentaram resultados semelhantes. No entanto, contra *Candida albicans*, os melhores resultados foram encontrados com o espécime coletado em Paranapiacaba. A diferença na sensibilidade observada pode ser devida à composição química diferente: na Ilha do Cardoso o componente principal era o eugenol (página 36, Figura 11 - estrutura química 2), enquanto em Piranapiacaba, o 4-metil-eugenol (página 36, Figura 11 - estrutura química 8) (Lima *et al.*, 2006).

Paula e colaboradores (2009) também avaliaram a atividade antimicrobiana desta espécie. Os extratos etanólicos brutos das folhas de *P. pseudocaryophyllus* coletadas em duas localidades geográficas brasileiras apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas. Os compostos fenólicos, taninos e flavonóides foram identificados na droga vegetal e podem estar envolvidos na ação antimicrobiana (PAULA *et al.*, 2009).

Com o propósito de encontrar a substância responsável pela atividade do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*, Santos (2010) avaliou a atividade antifúngica do chavibetol, metileugenol e eugenol, extraídos de espécimes coletados em Ilha Comprida, Cananéia e Ilha do Cardoso (SP). A análise dos resultados indicou o chavibetol (página 36, Figura 11 - estrutura química 17) como responsável pela atividade antifúngica deste óleo frente às linhagens de *Trichophyton spp.* e *Microsporum spp.*

Estas informações levam a inferir que essa espécie vegetal possui um potencial fitoterapêutico a ser pesquisado, uma vez que outras espécies da família Myrtaceae, apresentam atividade antimicrobiana, tais como *Pimenta dioica* (L.) Merr. (pimenta-da-jamaica) e *Eugenia caryophyllata* Thunb. (BARA; VANETTI, 1995; LI *et al.*, 2005).

2.5 Radicais livres e estresse oxidativo

Radical livre (RL) é todo átomo ou molécula que tem elétrons não pareados em sua camada eletrônica. São substâncias instáveis que se multiplicam em cascata e têm uma vida média extremamente curta. Os RLs cujo elétron encontra-se centrado nos átomos de oxigênio e nitrogênio são denominados, respectivamente, de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ABRAHAO *et al.*, 2010).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, como um processo fisiológico nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. (GREEN *et al.*, 2004). Estão envolvidos com a produção de ATP, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros (ABRAHAO *et al.*, 2010). Em determinadas condições, pode ocorrer elevação na produção de RLs, levando ao estresse oxidativo, durante o qual algumas destas espécies reativas, tais como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem produzir danos ao organismo (LEMOS, 2006).

O estresse oxidativo é causado pela deficiência do sistema protetor e/ou pelo excesso de agentes oxidantes e apresenta efeitos prejudiciais ao funcionamento das células, acelerando o processo degenerativo e a perda da estabilidade celular, provocando situações adversas ao organismo e seus tecidos, favorecendo a perda da homeostasia do meio interno (OLSZEWER, 2008).

Os RLs, por serem extremamente reativos e instáveis, participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos, particularmente moléculas importantes nas membranas celulares e ácidos nucleicos. Os efeitos dos RLs são amplos, mas quatro reações são particularmente relevantes para o mecanismo de lesão celular: peroxidação lipídica das membranas, modificações oxidativas das proteínas, lesões no ácido desoxirribonucléico (DNA) e lesão de reperfusão (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Espécies radicalares, na presença de oxigênio, podem causar peroxidação de lipídeos das membranas citoplasmáticas e das organelas. Os ácidos graxos insaturados dos lipídeos da membrana possuem ligações duplas entre alguns átomos de carbono. Tais ligações são vulneráveis ao ataque pelos radicais livres derivados do oxigênio, particularmente pela OH^- . As interações lipídeo-radical

liberam peróxidos que são em si espécies reativas, iniciando a subsequente redução de outro ácido graxo. Segue-se uma cadeia de reações auto catalíticas, resultando em extenso dano à membrana citoplasmática e das organelas (OLSZEWER, 2008).

Os RLs promovem ainda ligação cruzada, mediada por sulfidril, de aminoácidos lábeis, tais como metionina, histidina, cistina e lisina, além de causarem fragmentação de cadeias polipeptídicas. Essa modificação oxidativa aumenta a degradação de enzimas importantes por proteases neutras citossólicas, aumentando a destruição dentro da célula. As reações de radicais livres com a timina do DNA produzem quebras unifilamentares do DNA, e tais danos estão implicados tanto na morte celular como na transformação maligna das células (carcinogênese). O DNA mitocondrial também pode ser afetado (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Desta forma, o EO está relacionado a várias patologias, como artrite, câncer, doenças do coração e do pulmão, demência senil, esclerose múltipla, entre outras. O envelhecimento também é um evento relacionado com as espécies reativas de oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LEMON *et al.*, 2008).

2.6 Antioxidantes

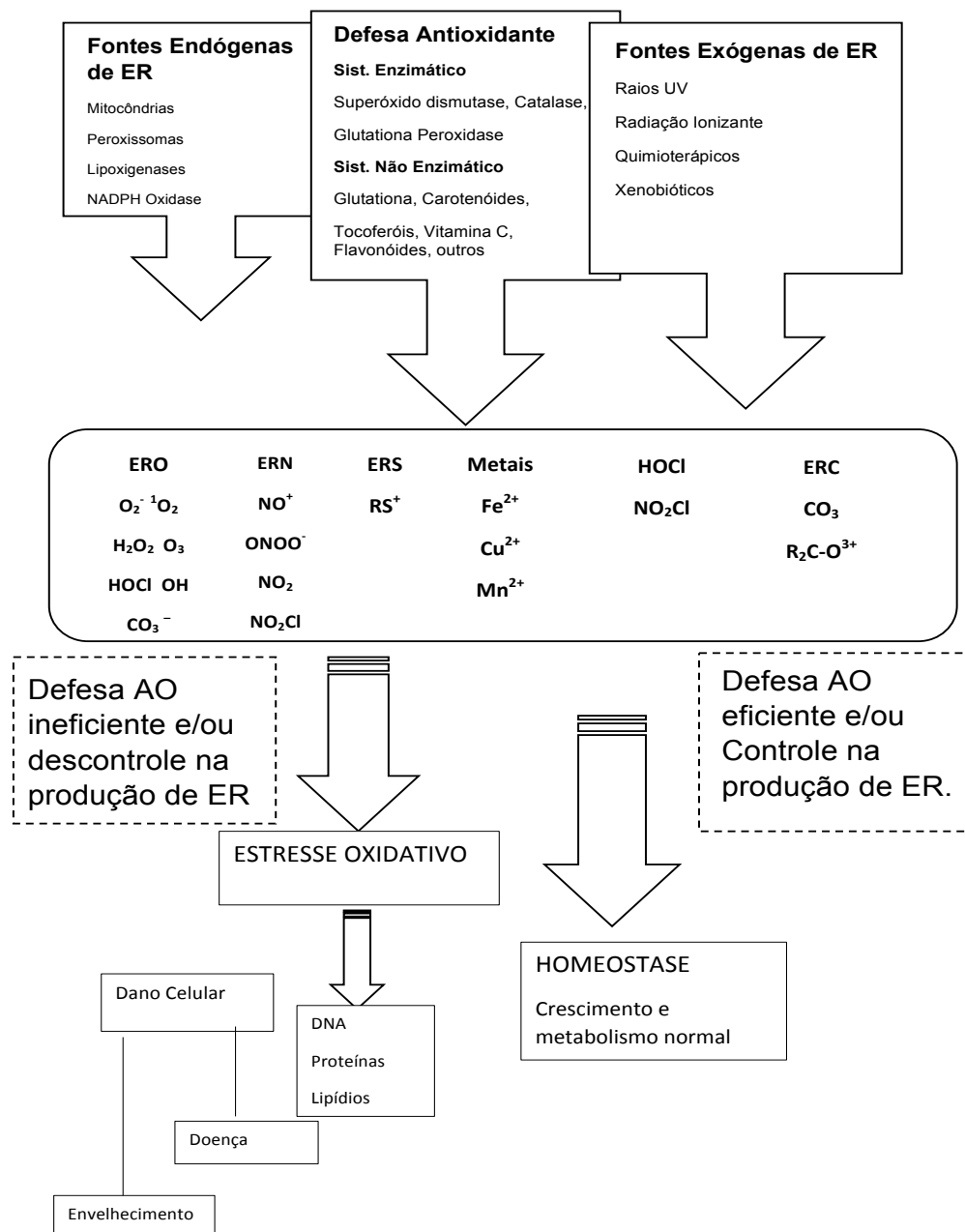
Os RLs são interceptados de dois modos: pela ação dos agentes antioxidantes endógenos ou exógenos; ou pelo mecanismo de oxido-redução, quando dois radicais se ligam. A capacidade antioxidante endógena é composta por várias vitaminas e enzimas como, por exemplo, as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase; além das vitaminas A, C e E. Desta forma, o EO só se origina na ocorrência de um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante do organismo e EROs ou ERNs, em favor das últimas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Antioxidantes são agentes que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia que seria prejudicial à célula; eles são neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SHAIHDI *et al.*, 2007).

Os agentes antioxidantes são de grande interesse, tanto pela indústria farmacêutica, devido a sua ação preventiva do EO, quanto pela indústria alimentícia,

por prevenirem a rancidez, ou seja, a oxidação lipídica dos alimentos (GIADDA, 2006; DAI *et al.*, 2009). Na Figura 16 estão representados de forma resumida os mecanismos de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, quando eficientes mantendo a homeostase e quando ineficientes, instalando estresse oxidativo causando danos às macromoléculas como DNA, proteínas, lipídios, que se expressam como envelhecimento ou doença.

Figura 16. Fontes exógenas e endógenas de produção de ERO e ERN. Sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, quando eficientes mantendo a homeostase e quando ineficientes, instalando estresse oxidativo



Neste contexto, várias pesquisas têm sido conduzidas na busca de novos compostos com atividade antioxidante que tenham potencial para prevenir ou reverter o EO e, assim, atuar na cura e prevenção de uma série de doenças (BEAL, 2006; HASSIMOTO *et al.*, 2009; RUFINO *et al.*, 2010). Dentre os produtos pesquisados, destacam-se as plantas medicinais, devido à presença de compostos com propriedades antioxidantes que fazem parte de seu metabolismo secundário. Neste grupo de constituintes, destacam-se os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Esses componentes podem atuar como agentes redutores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singletto e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; GIADDA, 2006).

Estudo desenvolvido por Campanini e colaboradores (2013) avaliou os possíveis efeitos de inibição do estresse oxidativo de formulações tópicas contendo o extrato etanólico obtido a partir das folhas de *P. pseudocaryophyllus* em ratos expostos à radiação UV. Os resultados obtidos sugerem que formulações contendo o extrato desta planta podem ser uma estratégia promissora para a prevenção do estresse oxidativo e danos inflamatórios da pele induzido por UV (CAMPANINI *et al.*, 2013).

2.7 Infecções fúngicas

Desde 1970, tem havido um aumento mundial na incidência de infecções fúngicas. Um dos fatores contribuintes foi o uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, que eliminam ou diminuem as populações bacterianas não patogênicas que normalmente competem com os fungos. Outras causas incluem a disseminação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), o uso de imunossupressores e de agentes quimioterápicos para o câncer e avanços das técnicas de transplantes de órgãos. O resultado foi o aumento da prevalência destas infecções oportunistas, de indivíduos sujeitos a falhas terapêuticas e recidivas, assim como o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos de uso corrente (RANG *et al.*, 2007; TASLEEM *et al.*, 2009).

As infecções fúngicas ou micoses abrangem algumas das doenças humanas mais comuns, provocadas por diversas espécies de fungos, que vão desde micoses superficiais até infecções mais graves e debilitantes (HOGAN *et al.*, 1996;

WANKE *et al.*, 2005). As micoses são classificadas de acordo com a sua localização no organismo, podendo ser divididas em micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e profundas (MACHADO *et al.*, 2008). As primeiras localizam-se nas camadas superficiais da pele e cabelo, e são responsáveis por processos inflamatórios. As micoses cutâneas, ou dermatomicoses, são infecções que envolvem as camadas mais profundas da epiderme e seus tegumentos, como cabelo e unhas. As subcutâneas atingem o tecido subcutâneo, músculo e fáscia. Por último, as micoses profundas ou sistêmicas, atingem órgãos internos e vísceras, podendo afetar múltiplos tecidos ou órgãos (CRIADO *et al.*, 2011; SAMALAIA *et al.*, 2011).

2.7.1 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea de evolução subaguda ou crônica, ocasionada por espécies de fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*, que afeta o homem e algumas espécies de animais como: cães, gatos, roedores, tatus, cavalos e aves (SCHUBACH *et al.*, 2008; MADRID *et al.*, 2010; SAZAKI *et al.*, 2014).

A infecção por *S. schenckii* está associada à inoculação traumática do micro-organismo na derme, por espinhos, farpas de madeiras, material vegetal, assim como por arranhadura e mordedura de animais contaminados (FERNANDES *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2013). Raramente a infecção ocorre por inalação do agente, podendo resultar nas formas pulmonar ou sistêmica da micose (SAZAKI *et al.*, 2014).

Em humanos, a esporotricose é considerada por alguns autores, uma doença ocupacional, envolvendo pessoas expostas a vegetais ou solo rico em matéria orgânica, como agricultores, floristas e jardineiros (FURTADO; ARMOND, 1981; KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2002; CRUZ, 2013). No entanto, nas últimas décadas são crescentes os relatos zoonóticos da micose envolvendo o felino doméstico, especialmente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná (LONDEIRO *et al.*, 1989; BARROS *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; CORDEIRO *et al.*, 2011).

Nos felinos, a contaminação pelo agente da esporotricose está relacionada aos hábitos peculiares da espécie, tais como esfregar-se no solo, afiar as garras em árvores e madeiras, seu instinto de caça, suas incursões além de seus limites domiciliares e seus hábitos higiênicos, entre os quais o ato de lambar-se e de enterrar suas fezes, o que os expõe a infecções e os possibilita transmitir a infecção a outros animais, inclusive ao ser humano (BARROS *et al.*, 2004).

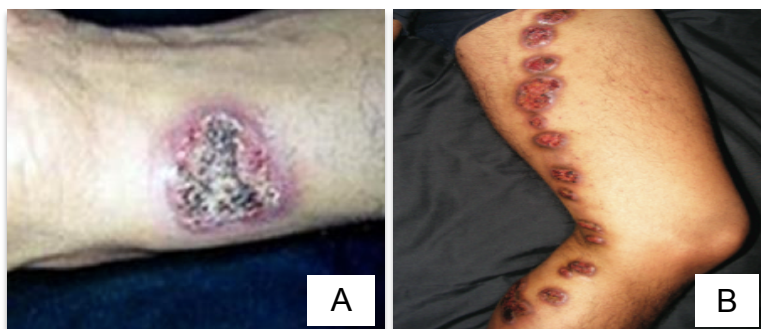
Estudo desenvolvido por Souza e colaboradores (2006) evidencia que a transmissão zoonótica do *S. schenckii* a humanos pelos felinos, é facilitada pelo grande número de leveduras presentes nas lesões desses animais infectados, assim como pela presença do agente nas unhas e cavidade bucal, destacando-se o risco de transmissão através destas vias (SOUZA *et al.*, 2006).

2.7.2 Formas clínicas da esporotricose

A esporotricose pode apresentar diferentes formas clínicas de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, quantidade do inóculo e virulência da linhagem fúngica (BUSTAMANTE *et al.*, 2004). São descritas as formas cutâneas (cutânea fixa, linfocutânea e cutânea disseminada), extracutâneas (pulmonar primária, ocular, articular e ósseo) e a forma sistêmica (FARIAS *et al.*, 1997; SAMPAIO *et al.*, 2000; VÁSQUEZ-DEL-MERCADO *et al.*, 2012).

A forma cutânea fixa da esporotricose é caracterizada por uma lesão primária restrita ao ponto de inoculação do fungo (Figura 17 A), enquanto que na linfocutânea ocorre comprometimento da cadeia linfática adjacente à lesão primária (Figura 17 B) (FERNANDES *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2013). Tais apresentações clínicas são as de maior ocorrência em cães e humanos, sendo que a forma cutâneo linfática corresponde de 70 a 80% de todas apresentações clínicas da doença em humanos (CORDEIRO *et al.*, 2011; MAHAJAN, 2014).

Figura 17. Esporotricose cutâneo localizada (A) e cutâneo linfática (B)



Fonte: A: ZAITZ *et al.*, 1998. B: MAHAJAN, 2014

Na cutânea disseminada, múltiplas lesões distribuem-se pelo tegumento cutâneo (Figura 18) e muitas vezes evoluem para forma sistêmica da doença com o envolvimento de um ou mais órgãos internos, incluindo tecido articular, ósseo, pulmonar, nervoso, hepático e ocular. Essa forma está associada frequentemente a indivíduos imunocomprometidos e felinos (APPENZELLER *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; VERGARA *et al.*, 2012).

Figura 18. Esporotricose cutâneo disseminada em humano (A) e felino (B)



Fonte: A: SIDRIM; ROCHA, 2004. B: Sociedade Brasileira de Dermatologia Veterinária. Disponível em: <http://www.sbdv.com.br/info.php?mtid=14>

2.7.3 Epidemiologia da doença

A esporotricose apresenta distribuição mundial, com maior prevalência em regiões de clima temperado e tropical, incluindo América Latina, África do Sul, Índia e Japão, sendo que a maioria dos casos são descritos na América Central e

América do Sul (MARTINEZ, 2006; SILVA, 2010; CRUZ, 2013). Inúmeros casos e indícios de endemicidade têm sido relatados em países como México, Peru, Colômbia, Brasil e Japão (BARROS *et al.*, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2011; BRAVO *et al.*, 2012)

A esporotricose é a micose subcutânea mais comum na América Latina. Tem sido relatada no Brasil desde 1907, tendo uma maior casuística na região metropolitana do Rio de Janeiro e no litoral Sul do Rio Grande do Sul (ROSA *et al.*, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2011).

Durante as últimas décadas ocorreu um significativo aumento dos casos de esporotricose no Brasil, principalmente na região metropolitana do Rio de Janeiro, onde vem se manifestando uma epidemia em seres humanos correlacionada com a transmissão por felinos (MARIMON *et al.*, 2007; CRUZ, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013). A espécie *S. brasiliensis*, descrita como a mais virulenta do complexo *S. schenckii*, é apontada como predominante no acometimento destes casos (OLIVEIRA *et al.*, 2011a; RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2013).

No Rio de Janeiro, a primeira descrição de caso de esporotricose em felino ocorreu em 1998 (BARONI *et al.*, 1998). A partir deste período, o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) vem acompanhando a ocorrência epidêmica dessa micose na região metropolitana do Rio de Janeiro, que é considerada a primeira epidemia associada a transmissão zoonótica na literatura mundial (BARROS *et al.*, 2008).

Entre 1998 e 2004, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) diagnosticou 1.503 gatos, 64 cachorros e 759 humanos com a doença. Barros e colaboradores (2001) descreveram 178 casos humanos atendidos pelo Instituto Nacional de Infectologia (Ipec) entre 1998 e 2001. Martinez (2006) apresentou o seguimento dessa epidemia, com 572 casos entre 2002 e 2004. Em 2009, Freitas e colaboradores deram continuidade ao estudo clínico, analisando 804 casos entre 2005 e 2008 (FREITAS *et al.*, 2010). Dados mais recentes relatam mais de 2.200 casos de esporotricose humana ocorridos no Rio de Janeiro, o que indica uma epidemia na cidade (BRAVO, 2012; CRUZ, 2013).

2.7.4 Fungos do complexo *Sporothrix schenckii*

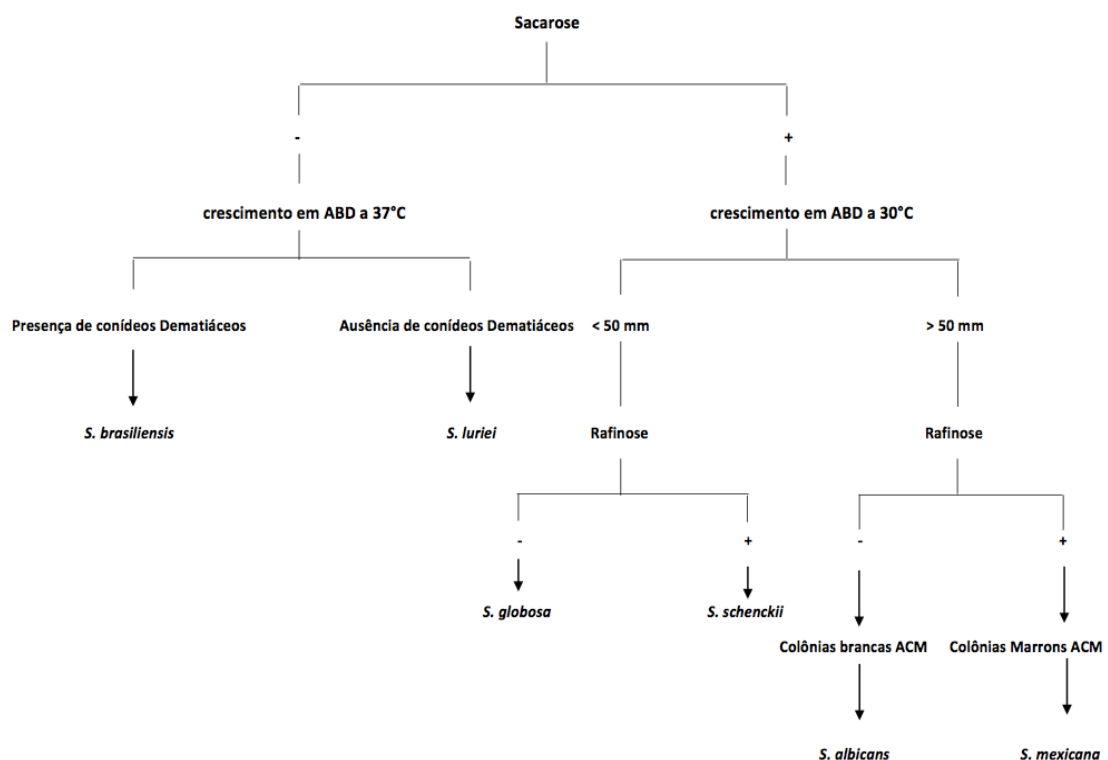
Estudos moleculares recentes demonstraram que *S. schenckii* é um

complexo constituído de pelo menos seis espécies clinicamente importantes com diferenças significativas na distribuição geográfica, propriedades bioquímicas (assimilação de dextrose, sacarose e rafinose), grau de virulência, diferentes padrões de doença e resposta à terapia. Estas incluem *S. lurie*, *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa* e *S. schenckii stricto sensu* (MARIMON *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2014; SÁNCHEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015).

S. schenckii é encontrado predominantemente nos continentes americano, asiático e africano; *S. mexicana* foi isolado exclusivamente no México, *S. globosa* é uma espécie encontrada com alta frequência na Europa e na Ásia; *S. brasiliensis* foi isolado exclusivamente no Brasil e *S. lurie* é um agente patogênico raro (MARIMON *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014).

A classificação das espécies de interesse clínico do complexo *S. schenckii*, pode ser baseada em características morfológicas e fenotípicas, conforme a chave de classificação proposta por Marimon e colaboradores (2007) (Figura 19).

Figura 19. Chave de identificação das espécies de interesse clínico do complexo *S. Schenckii* proposta por Marimon e colaboradores (2007)



ABD: ágar batata dextrose e ACM: ágar farinha de milho

Fonte: adaptado de MARIMON, 2007

Estudos sobre biologia molecular, particularmente nos campos da genômica, proteômica e metabolômica, têm gerado novos parâmetros de classificação para as espécies fúngicas, permitindo a identificação de várias sequências gênicas que passaram a ser utilizadas como marcadores moleculares de fungos. Diversas técnicas de Biologia Molecular têm sido empregadas para a identificação do *S. schenckii*, destacando-se entre elas a fluorescência e a reação da polimerase em cadeia (PCR) (TATEISHI *et al.*, 1996; ISHIZAKI *et al.*, 2009; CRUZ, 2013).

Entretanto, por si só, nenhuma das diversas técnicas utilizadas conseguiu gerar informações suficientes para definir e classificar as espécies fúngicas. É indispensável reunir diferentes características, morfológicas, ecológicas, bioquímicas, fisiológicas, nutricionais e genéticas, numa análise multifatorial, denominada de taxonomia polifásica, cuja aplicação é cada vez mais frequente em micologia.

Estudos recentes têm mostrado diferenças importantes nos perfis de virulência e resistência a drogas entre as espécies no complexo *S. schenckii*. *S. brasiliensis* foi descrita como a espécie mais virulenta. Em contraste, *S. globosa* e *S. mexicana* mostraram pouca ou nenhuma virulência em modelo murino (MONCRIEFF *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013).

Os fatores de patogenicidade que têm sido relatados para o *S. schenckii* são: a termotolerância, o dimorfismo, as enzimas extracelulares e a presença de melanina (NOBRE, 2004; MONCRIEFF *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2013).

A temperatura ideal para o crescimento do *S. schenckii* varia entre 25° a 27°C, havendo a sua inibição entre 39° e 40°C, embora alguns isolados tenham a capacidade de se multiplicar em temperatura entre 40° e 41°C. Estudos evidenciaram que isolados incapazes de crescer a temperaturas superiores a 37°C estariam associados à forma cutânea da micose, enquanto que os mais termotolerantes estariam aptos a se desenvolver nos órgãos internos, levando ao desenvolvimento da forma sistêmica da esporotricose (KONG *et al.*, 2006; ARECHAVALA *et al.*, 2011).

Devido ao seu dimorfismo, o *S. schenckii* apresenta-se na forma filamentosa em temperatura de 28°C e em meio ácido e na forma de levedura a 37°C e em meio básico (SÁNCHEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015). O dimorfismo do *S. schenckii* é um dos fatores relacionados à sua virulência, atribuindo ao agente maior

capacidade de proteção diante ao sistema imune do hospedeiro (CORREA *et al.*, 1991).

Em sua forma filamentosa, o *S. schenckii* apresenta-se inicialmente como colônia branca a amarelada, de aspecto sedoso, membranoso, às vezes com micélio aéreo, que com a maturidade do cultivo (15 dias) torna-se pregueada e escurecida (Figura 20 A). Microscopicamente são observadas hifas finas, septadas, ramificadas, medindo 1-2 μm de diâmetro com conidióforos alongados, simpodiais, contendo ápices intumescidos, frutificando conídios hialinos, elípticos ou ovais dispostos em forma de rosetas (Figura 20 B) (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2013).

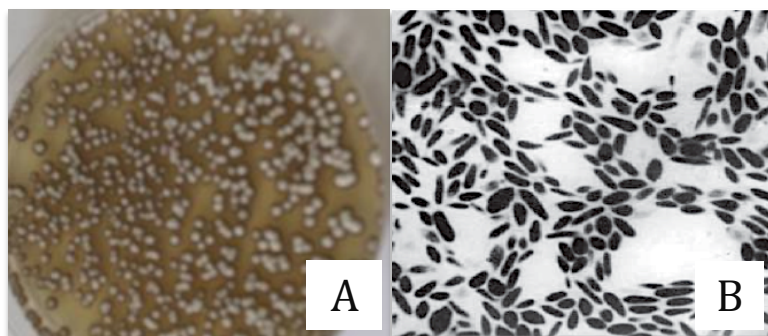
Figura 20. Colônia de *S. schenckii* cultivado em ágar *Sabouraud* dextrose durante a sua fase filamentosa vista macroscopicamente (A) e microscopicamente (B).



Fonte: A: <http://pathmicro.med.sc.edu/mycology>. B: DIXON *et al.*, 1991

Em parasitismo ou *in vitro* a 37°C, a colônia adota aspecto leveduriforme de coloração creme a acinzentada (Figura 21 A) com micromorfologia caracterizada por células pequenas, arredondadas, ovais ou no formato de “charutos”, com brotamento simples ou múltiplo (Figura 21 B) (LACAZ *et al.*, 2002; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006).

Figura 21. Colônia de *S. schenckii* cultivado em ágar *Sabouraud* dextrose durante a sua fase leveduriforme vista macroscopicamente (A) e microscopicamente (B)



Fonte: A: MARTINS, 2008. B: BRAVO, 2012

As enzimas extracelulares produzidas por *S. schenckii*, como as proteinases I e II, desempenham importante função na invasão tecidual, provocando a lise do estrato córneo, colágeno tipo I e elastina da pele, permitindo desta forma, a invasão tecidual e o desenvolvimento da infecção fúngica (YOSHIKE *et al.*, 1993; ARNOLD *et al.*, 1986; HOGAN *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2001).

Pesquisas têm demonstrado que o *S. schenckii* produz melanina dihidroxinaftaleno nas fases filamentosa e leveduriforme, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NOBRE *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2007; MADRID *et al.*, 2011). Durante a infecção, os grânulos de melanina interferem na ativação da resposta imune do hospedeiro, mais especificamente na ativação do complemento. Além disso, a melanina confere proteção ao fungo contra agentes químicos e físicos (MORRIS-JONES *et al.*, 2002; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009). Foi demonstrado, que uma linhagem de *S. schenckii* com presença de melanina é capaz de ter uma grande capacidade invasiva e promover a formação de granulomas multifocais, ao contrário de uma linhagem albina, com o mesmo perfil genotípico (BARROS *et al.*, 2011).

Estes fatores de virulência favorecem a invasão tecidual e dificultam a resposta imune, propiciando a instalação e permanência do microrganismo no hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

2.7.5 Farmacoterapia da esporotricose

O mesmo caráter eucariota, entre as células fúngicas e as dos hospedeiros, dificulta a escolha de alvos farmacológicos, resultando em medicamentos antifúngicos de estreita faixa terapêutica e com elevada toxicidade, limitando a utilização e influenciando no custo para o desenvolvimento destes produtos (PAPPAS *et al.*, 2000; ROMANI; PUCCETTI, 2007).

Dentre os principais fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento da esporotricose, o iodeto de potássio, a anfotericina B, o itraconazol e a terbinafina figuram como os mais extensivamente utilizados. A escolha terapêutica é dependente da forma clínica, da extensão das lesões cutâneas, do envolvimento sistêmico da micose e dos efeitos adversos dos medicamentos (NOBRE *et al.*, 2004; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006).

Entretanto, os fármacos utilizados atualmente no tratamento da esporotricose não satisfazem completamente a necessidade médica humana e veterinária, devido, principalmente aos problemas relacionados a espectro de ação, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos antifúngicos disponíveis (HEIDRICH *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2013).

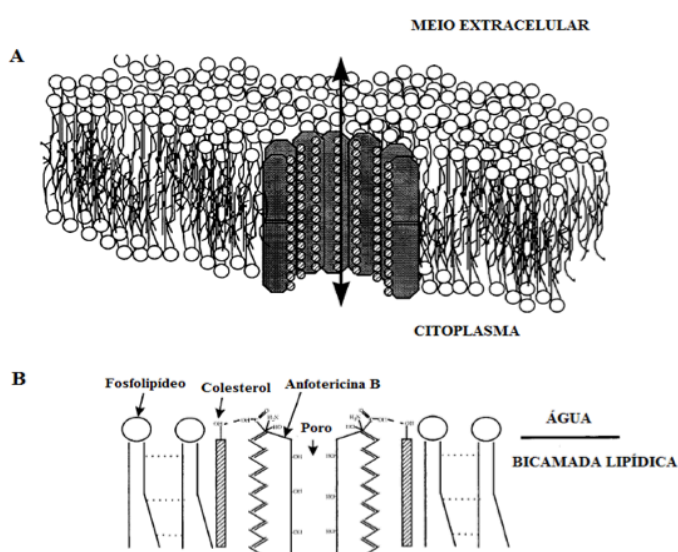
2.7.5.1 Iodetos

O iodeto de potássio (KI) é um fungicida de amplo espectro indicado principalmente em dermatofitoses, sendo contraindicado em pele inflamada, por ser irritante. Hiruma e Kagawa (1987) evidenciaram que quando as leveduras do *Sporothrix schenckii* são expostas a concentrações crescentes da droga, ocorre lise celular através da liberação de enzimas lisossomais (HIRUMA; KAGAWA, 1987).

A solução saturada de iodeto de potássio (SSKI) é indicada para o tratamento das formas cutânea fixa e linfocutânea da esporotricose desde 1900. Entretanto, o KI não é recomendado em casos de esporotricose cutâneo disseminada ou sistêmicas (COSTA *et al.*, 2013). Em Medicina Veterinária tem seu uso limitado, devido aos frequentes efeitos tóxicos que ocorrem principalmente nos felinos, espécie normalmente sensível aos preparados contendo iodo, na qual o esquema terapêutico é frequentemente interrompido devido ao aparecimento de

celular permite o escape de constituintes citoplasmáticos, principalmente íons potássio, que provoca um desequilíbrio eletrolítico e homeostático, resultando na inibição do crescimento e eventualmente em morte celular (Figura 23) (RANG; DALE, 2007; GRAY *et al.*, 2012).

Figura 23. Representação esquemática da interação entre a anfotericina B e esteróis de membrana.



(A) Canal na membrana plasmática formado pela união de poros. (B) Orientação molecular das ligações anfotericina B e esteróis formando os poros. As linhas pontilhadas entre as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolípidos representam as forças de van der Waals. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio formadas entre a anfotericina B e as moléculas de esteróis.

Fonte: GHANNOUM *et al.*, 1999

A anfotericina B além de se ligar ao ergosterol, também pode, embora em menor extensão, se ligar a outros esteróis, como ao colesterol, o que justifica, em grande parte, a magnitude da toxicidade associada ao seu uso. A nefrotoxicidade, um dos efeitos adversos mais importantes, ocorre, geralmente, no início da terapia, sendo decorrente da diminuição na taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, resultando em azotemia e oligúria (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; COSTA *et al.*, 2011).

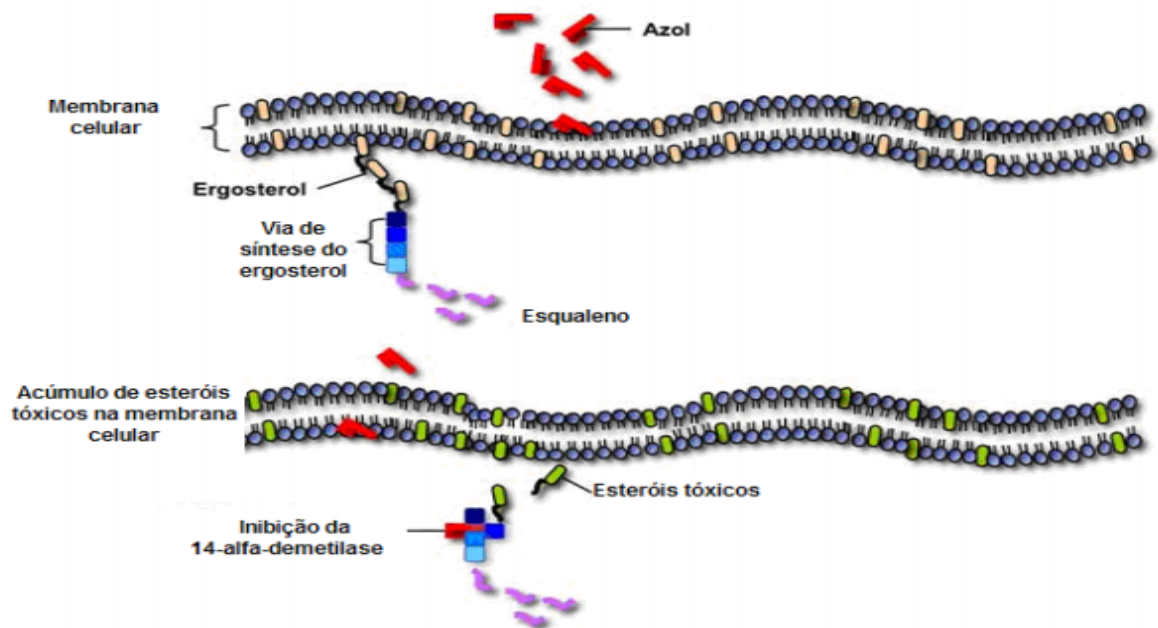
O uso da anfotericina B é recomendado nas formas extracutânea e sistêmica da esporotricose humana e nos casos não responsivos à terapêutica convencional (KAUFFMAN *et al.*, 2000). Este fármaco administrado por via intravenosa em gatos com esporotricose não apresentou resultados satisfatórios devido à ocorrência de efeitos adversos e óbitos (DUNSTAN *et al.*, 1986; FARIAS *et al.*, 1997). Assim, mesmo com boa atividade frente ao *S. schenckii*, os frequentes

efeitos adversos limitam o seu uso.

2.7.5.3 Azóis

Os azóis atuam inibindo a incorporação do ergosterol na membrana plasmática fúngica, pela inibição da enzima lanosterol-14- α -demetilase, ocasionando alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática, que impedem o crescimento fúngico, gerando alterações morfológicas e necrose celular (Figura 24) (RANG; DALE, 2007).

Figura 24. Mecanismo de ação dos azóis



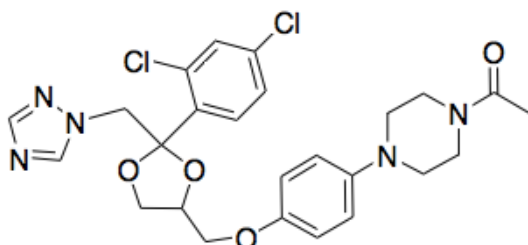
Fonte: MANFRINI, 2007

2.7.5.3.1 Cetoconazol

O cetoconazol (Figura 25), desde o seu desenvolvimento, no final da década de 1970, se tornou um importante agente antifúngico sendo amplamente utilizado devido à facilidade de administração, eficácia e baixo custo (HEIDRICH *et al.*, 2011). Entretanto, este fármaco apresenta toxicidade seletiva baixa, isto é, inibe tanto o citocromo P-450 do fungo quanto o dos mamíferos, o que leva à ocorrência

de efeitos adversos, como: hepatotoxicidade, com aumento frequente das enzimas hepáticas, anorexia, depressão, náuseas, vômitos e diarreia (ROCHETTE *et al.*, 2003).

Figura 25. Estrutura química do cetoconazol



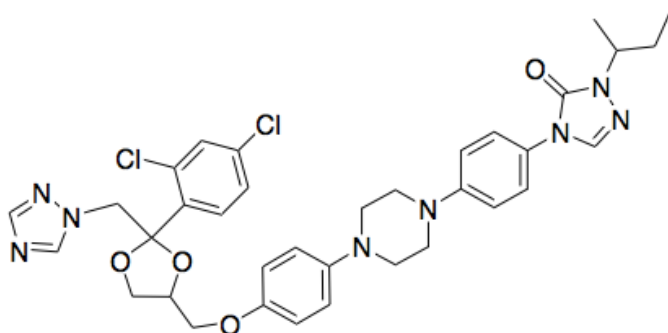
Fonte: NOBRE *et al.*, 2002

Pereira e colaboradores (2010) trataram 598 gatos com esporotricose com cetoconazol oral, de 50 a 100 mg, a cada 12 ou 24 horas (13,5-27,0 mg/kg/dia). A cura clínica foi observada em 28,5% dos gatos num tempo mediano de tratamento de 28 semanas e em 42,1% dos casos, houve a ocorrência de efeitos adversos gastrintestinais, sendo a hiporexia o mais frequente. Segundo Bennet (2006), o cetoconazol tem sido substituído pelo itraconazol no tratamento das micoses, exceto quando o baixo custo do primeiro superar as vantagens do itraconazol.

2.7.5.3.2 Itraconazol

Desde a sua introdução na terapêutica, na década de 1980, o itraconazol (Figura 26) vem sendo amplamente empregado no tratamento das micoses superficiais e sistêmicas inclusive em pacientes imunocomprometidos. Em especial para a esporotricose, o fármaco demonstrou grande atividade em estudos *in vitro* e *in vivo*, em pacientes com as formas cutâneas, linfocutâneas e extra-cutâneas da micose (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; MEINERZ *et al.*, 2007; RAMÍREZ; RODRÍGUEZ, 2007).

Figura 26. Estrutura química do itraconazol



Fonte: NOBRE *et al.*, 2002

A maior especificidade pelas enzimas do citocromo P-450 dos fungos, é a principal vantagem do uso do itraconazol, além de não apresentar efeito significativo sobre o metabolismo de andrógenos e cortisol (BARROS *et al.*, 2011). Apesar do itraconazol ser considerado um fármaco com reduzida toxicidade em relação aos outros azóis é contraindicado em gestantes, lactantes e em pacientes com doença hepática (CATALÁN; MONTEJO, 2006; BARROS *et al.*, 2011).

O itraconazol é considerado o fármaco de escolha para humanos e felinos com esporotricose, devido à sua efetividade e por estar menos associado a efeitos adversos quando comparado aos demais agentes antifúngicos (CRUZ, 2013).

As vantagens relacionadas a este fármaco levaram a sua intensa utilização, sendo, atualmente, um dos antifúngicos mais utilizados nas clínicas médicas humana e veterinária. Todavia, devido principalmente ao seu uso indiscriminado, têm sido observados frequentes relatos de isolados fúngicos resistentes com consequentes falhas terapêuticas e remissão de enfermidades micóticas (SILVEIRA *et al.*, 2009; MEINERZ *et al.*, 2007). Isolados clínicos de *S. schenckii* de gatos do Rio de Janeiro, sugeriram resistência ao itraconazol, com altos valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) em comparação aos de seres humanos estudados e aos da literatura (KOHLENER *et al.*, 2004).

Diante da importância clínica e alta incidência das micoses causadas por fungos dematiáceos, do aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, do surgimento de linhagens fúngicas resistentes e da toxicidade dos antifúngicos existentes, é de fundamental importância a busca por novos agentes antifúngicos mais eficazes, menos tóxicos, sendo os produtos derivados de plantas medicinais excelentes alternativas para esse propósito.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar fitoquimicamente, avaliar o potencial antifúngico frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, a atividade antioxidante e a citotoxicidade preliminar, dos óleos essenciais adquirido comercialmente (OCM) e obtido por extração no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (OEX) e do extrato hidroetanólico 95% (v/v), obtidos a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

3.2 Específicos

- Realizar o *screening* fitoquímico a partir do extrato hidroetanólico 95% (v/v) das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.
- Determinar o teor de constituintes fenólicos totais, flavonoides e taninos nas folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* por espectrofotometria no UV-VIS.
- Identificar os principais componentes dos óleos essenciais (OCM e OEX), obtidos a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais (OCM e OEX), do eugenol, do extrato hidroetanólico 95% (v/v) e das frações obtidas a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* pelo método de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- Avaliar a atividade antifúngica, estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais (OCM e OEX), eugenol, extrato hidroetanólico 95% (v/v), obtidos a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*, frente às principais linhagens de fungos causadoras de esporotricose no Brasil.
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as principais alterações morfológicas nas estruturas fúngicas, ocasionadas pelos produtos naturais (OCM, OEX e eugenol) e fármacos de referência, tendo como base

de comparação a célula fúngica que não foi exposta a nenhuma substância antifúngica.

- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais (OCM e OEX), eugenol e extrato hidroetanólico 95% (v/v) obtidos a partir das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* frente à linhagem celular de fibroblasto murino (L929).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Agitador ultra-sônico (Unique). Modelo: Ultrasonic cleaner
- Agitador vortex (Phoenix Luferco). Modelo: AP-5
- Balança analítica (Sartorius). Modelo: TE214S
- Balança analítica (Schimadzu). Modelo: AX200
- Capela de Fluxo laminar (TROX Fluxo Laminar). Modelo: 3027
- Centrifuga (Eppendorf). Modelo: 5417R
- Cromatógrafo a Gás (Shimadzu) Modelo: QP2010Plus
- Coluna capilar (Restek). Modelo: Rtx5-MS
- Espectrofotômetro (Biospectro). Modelo: SP-220
- Espectrofotômetro (Biochrom). Modelo: Libra S12
- Espectrofotômetro leitor de microplaca (Espectra Count™ packard)
- Estufa (Fanem). Modelo: BK13010
- Estufa Bacteriológica (Novatecnica). Modelo: 169
- Liofilizador (Christ Alpha). Modelo: 1-4 LDplus
- Metalizador (DENTOM VACUUM). Modelo: Desk IV
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL). Modelo: 6390L
- Microscópio óptico (NIKON). Modelo C-D5
- Micropipetas (Gilson e Labtex)
- Manta aquecedora (Fisotom)
- Phgômetro (Micronal). Moldelo B-474
- Rotavapor (Buchi). Modelo: R-215
- Sistema purificador de água Osmose Reversa (Gehaka). Modelo: OS20LX
- Ponto crítico (Leica). Modelo: Leica EM- CPD030

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram: acetato de etila (Vetec), ácido acético glacial (Proquímios), ácido ascórbico (Sigma), ácido gálico (Merk), anfotericina (Cristália), Cetoconazol (Sigma), cloreto de alumínio anidro (Carlo Erba Reagenti) diclorometano (Vetec), DPPH (Aldrich Chemistry), eugenol (Aldrich Chemistry), hexano (Hêxodo científica), itraconazol (Sigma Life Science), metanol (Tedia), piridina (Synth), polilisina (Sigma), quercetina (Merk), RPMI 1640 (Sigma), SDA (Hi Media), SDB (Hi Media), tetróxido de ósmio (Sigma), tween (Sigma).

4.3 Material vegetal

As folhas de *P. pseudocaryophyllus* variável *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, foram gentilmente cedidas pela Associação de Produtoras de Cataia da Barra do Ararapira, área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, litoral norte do Paraná, Brasil.

A planta foi coletada na Serra Gigante, Pico Pasmado, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil (Latitude: 25.3067. Longitude: -48.3289). A identificação botânica foi feita pelo Professor Doutor Alan Yukio Mochinski e a exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica (UPCB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número UPCB-49.557.

4.4 Obtenção do óleo essencial, extrato bruto e frações

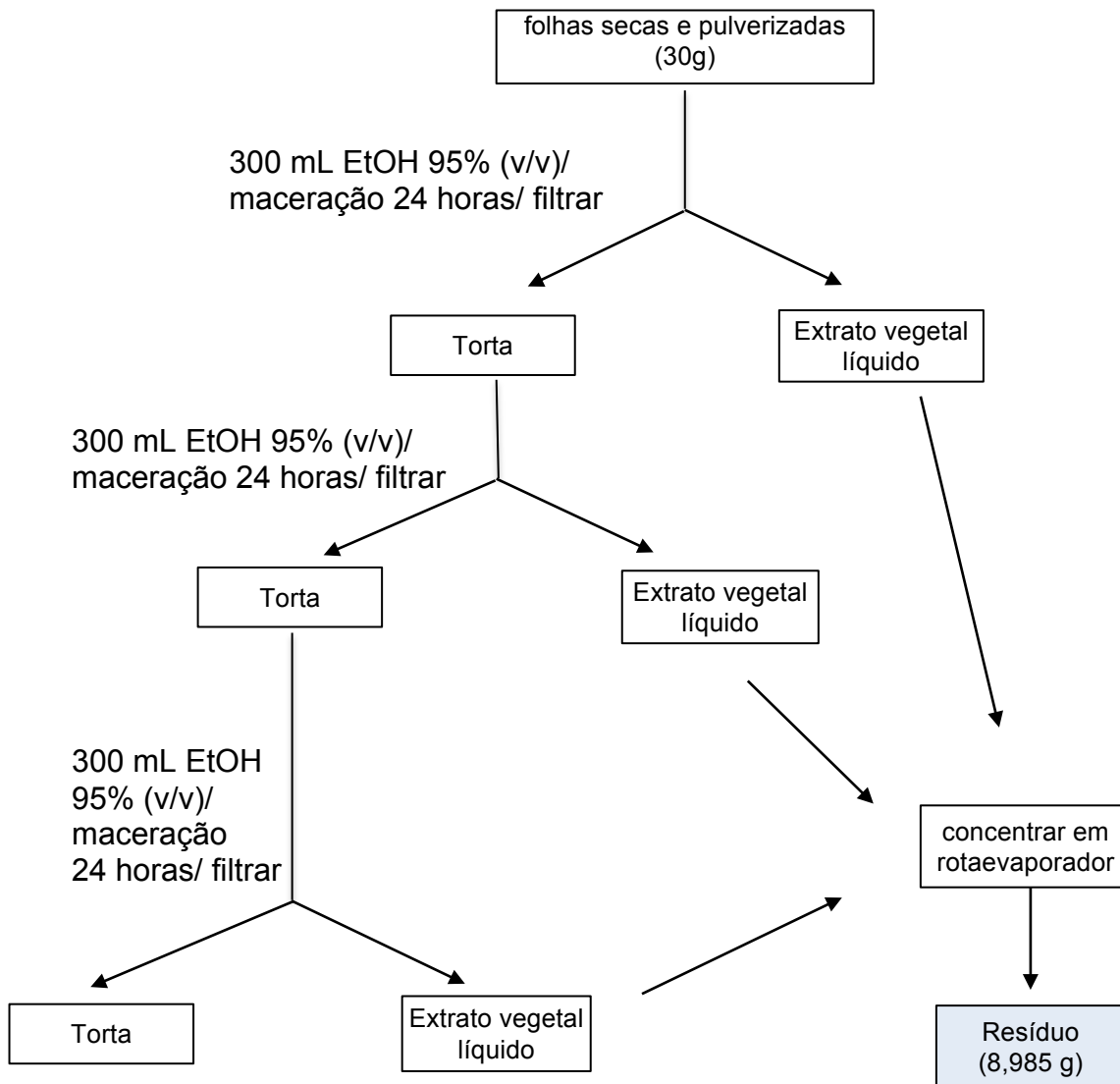
Óleos essenciais

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas secas de *Pimenta pseudocaryophyllus*, por hidrodestilação (4 horas), utilizando aparelho de Clevenger, conforme método descrito na Farmacopéia Brasileira V (BRASIL, 2010). Também foi utilizado no estudo o óleo essencial adquirido comercialmente da empresa Laszlo® Aromatologia Ltda (Lote: CRAVOCaO2), a qual também utiliza para a obtenção do óleo o método de hidrodestilação.

Extrato bruto

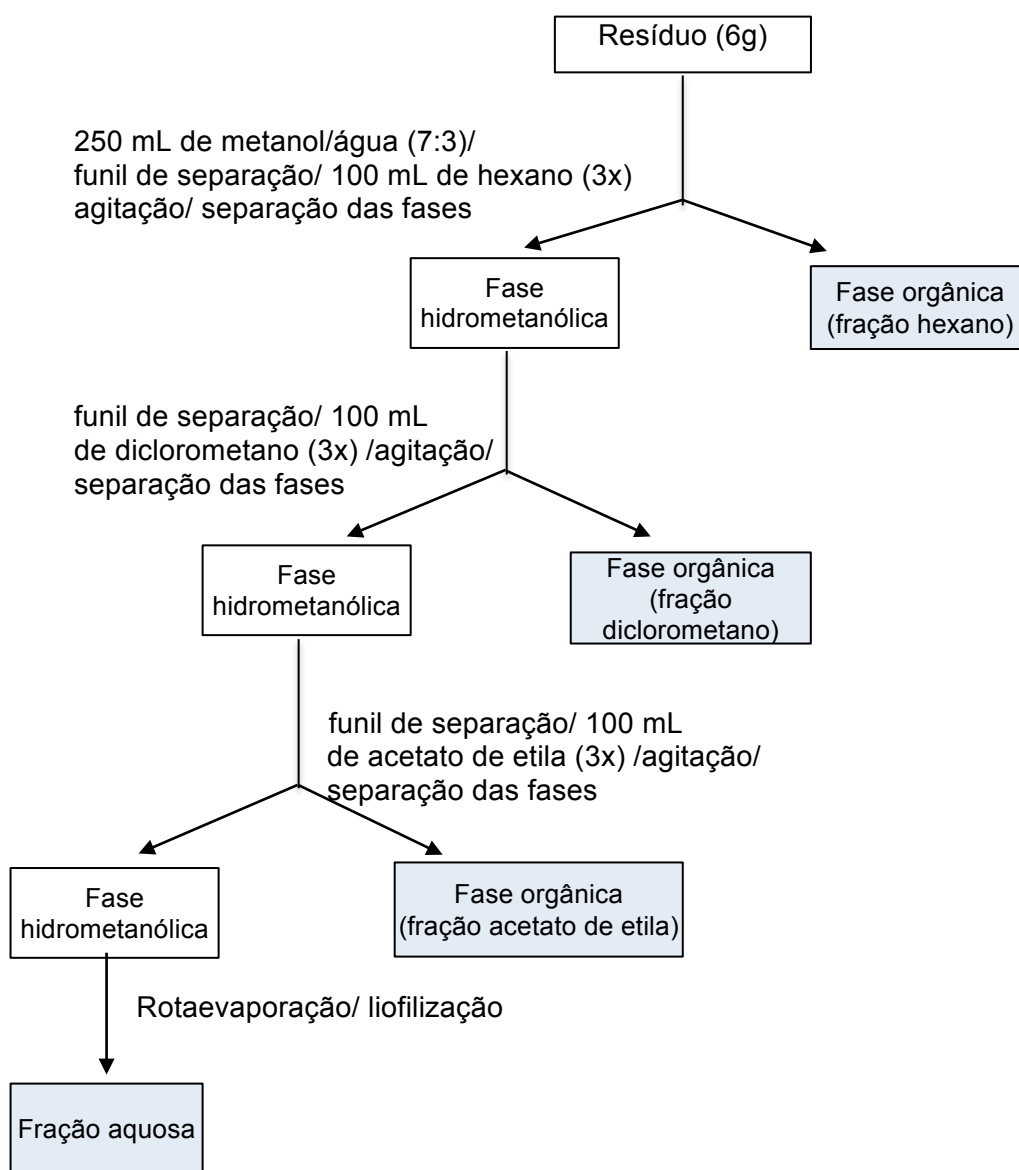
O extrato hidroetanólico bruto foi obtido por maceração dinâmica das folhas secas e pulverizadas (30g) em etanol 95% (v/v), na proporção 1:10 (p/v), seguida de filtração e concentração em aparelho rotaevaporador (Rotavapor Buchi, R-215) em temperatura inferior a 40°C. A torta resultante foi submetida a mais três extrações como a descrita acima. O extrato vegetal líquido foi concentrado em rotaevaporador (Buchi, R-215) e reunido, sendo denominado de resíduo (Figura 27).

Figura 27. Representação esquemática do procedimento realizado para a obtenção do extrato hidroetanólico 95% (v/v)



As frações foram obtidas a partir de 6 g do resíduo, o qual foi dissolvido em 250 mL de metanol/água (7:3). A solução obtida foi submetida a partições líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila). Para tal, o resíduo solubilizado em metanol/água foi transferido para um funil de separação. Foram adicionados 100 mL de hexano, agitou-se e após a separação das fases, em um recipiente seco, a fase hexânica foi recolhida. Foram realizadas mais duas extrações subsequentes com 100 mL de hexano. Repetiu-se o mesmo procedimento com os solventes diclorometano e acetato de etila. Os solventes de cada fração foram evaporados em rotaevaporador (Buchi, R-215) e cada fração foi dessecada até peso constante. Para a fração metanol/água final, o metanol foi retirado em rotaevaporador e a fração aquosa resultante foi liofilizada (Liofilizador Christ Alpha, 1-4 LDplus). Desta forma, foram obtidas quatro frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa (Figura 28). Estas frações foram identificadas e armazenadas sob congelamento a -20°C , até o momento de utilização.

Figura 28. Representação esquemática do procedimento realizado para a obtenção das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa



4.5 Screening fitoquímico com o extrato bruto

O *screening* fitoquímico foi realizado por meio de reações cromogênicas, fluorogênicas e de precipitação, baseado nos protocolos propostos por Matos (2009) e pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2013) com adaptações.

4.5.1 Identificação de flavonoides

Solubilizou-se, sob aquecimento, 0,2 g do extrato bruto em 15 mL de etanol 70%. Em seguida, realizou-se as seguintes reações para detecção de flavonoides:

a) Reação com $AlCl_3$: umedeceu-se um papel filtro com o extrato obtido e acrescentou-se uma gota de solução alcoólica de $AlCl_3$ a 5%. Avaliou-se o papel filtro sob a luz ultra-violeta (U.V.). A presença de fluorescência sob a luz U.V. é indicativa da presença de flavonoides.

b) Reação com H_3BO_3 : acrescentou-se aos 5 mL do extrato obtido, 3 mL de solução de ácido bórico a 3% e 1 mL de solução de ácido oxálico a 10% e, em chapa de aquecimento, evaporou-se a mistura. Após o esfriamento, adicionou-se 10 mL de éter e avaliou-se sob a luz U.V. O aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada é indicativo da presença de flavonoides.

c) Reação com NaOH 1N: adicionou-se aos 5 mL do extrato obtido, 0,5 mL de solução de NaOH 1N. A coloração amarela indica a presença de flavonoides.

d) Reação de Shinoda: acrescentou-se aos 2 mL do filtrado, 2 a 3 fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de HCl concentrado. A coloração rósea avermelhada é indicativa da presença de flavonoides.

4.5.2 Identificação de taninos

Solubilizou-se, sob aquecimento, 0,2 g do extrato bruto em 10 mL de água destilada e adicionou-se 2 mL do extrato obtido em cinco tubos de ensaios para a realização das seguintes reações:

a) Reação com acetato de chumbo: adicionou-se ao extrato gotas da solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de precipitado branco é indicativa da presença de taninos.

b) Reação com acetato de cobre: adicionou-se ao extrato algumas gotas de solução de acetato de cobre a 3%. A formação de precipitado escuro indica a presença de taninos.

c) Reações de sais de ferro: adicionou-se ao extrato 5 mL de água e algumas gotas da solução de cloreto férrico a 2%. A formação de precipitado de cor verde é indicativa da presença de tanino condensado, enquanto a formação de precipitado de cor azul indica a presença de tanino hidrolisável.

d) Reações com alcalóides: adicionou-se ao extrato uma gota de solução de ácido clorídrico a 10% e algumas gotas de solução de sal de alcalóides solúveis a 0,1%. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

e) Reação com gelatina: adicionou-se ao extrato uma gota de solução de ácido clorídrico a 10% e uma gota de solução de gelatina a 2,5%. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

4.5.3 Identificação de cumarinas

Solubilizou-se 0,2 g do extrato bruto em 10 mL de etanol 70% e adicionou-se 1 mL de solução de HCl a 10%. Transferiu-se o extrato obtido para um funil de separação e acrescentou-se 10 mL de acetato de etila. Recolheu-se a fração acetato de etila em um tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de solução de KOH 5%. A Fluorescência azul esverdeada após a exposição à luz UV (365 nm) indica a presença de cumarinas.

4.5.4 Identificação de saponinas

Solubilizou-se, sob aquecimento, 0,2 g do extrato bruto em 10 mL de água destilada. Após o resfriamento, transferiu-se o extrato para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo de ensaio durante 15 segundos, seguido de repouso por 15 minutos. A presença de espuma no tubo de ensaio, superior a 1 cm e persistente após a agitação, é indicativa da presença de saponinas.

4.5.5 Identificação de alcaloides

Em um béquer, pesou-se 0,5 g do extrato bruto, adicionou-se 10 mL de solução de ácido clorídrico a 1% e aqueceu-se a mistura por 10 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se para um funil de separação e alcalinizou-se a mistura com solução de NH_4OH a 10%. Extraíu-se a solução alcalina com 2 porções de 10 mL de clorofórmio P.A. e filtrou-se a fração clorofórmica para um béquer. Evaporou-se o clorofórmio em banho-maria e ressuspendeu-se o resíduo com 5 mL de solução de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se 1 mL da solução obtida para 4 tubos de ensaio e adicionou-se os reagentes de Drangendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat. O aparecimento de precipitados indica a presença de alcalóides.

4.5.6 Identificação de antraquinonas

Reação de Borntraeger: Pesou-se 0,2 g do extrato bruto, adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico 2N e levou-se a aquecimento sob fervura por 10 minutos. Após o esfriamento, filtrou-se a mistura obtida para um funil de separação e adicionou-se 10 mL de acetato de etila. Recolheu-se a fração acetato de etila em um tubo de ensaio, acrescentou-se 2 mL de hidróxido de sódio 2N e agitou-se o tubo de ensaio. O aparecimento de uma intensa coloração vermelha na camada aquosa indica a presença de antraquinonas.

4.5.7 Identificação de triterpenóides e esteróides

Solubilizou-se, sob aquecimento, 0,5 g do extrato bruto em 10 mL de etanol 50%, adicionou-se 10 mL de solução saturada de acetato básico de chumbo e centrifugou-se. Filtrou-se o líquido sobrenadante para um funil de separação, adicionou-se água destilada e extraíu-se a solução hidroalcoólica com duas porções de 10 mL de clorofórmio. Reuniu-se os extratos clorofórmicos e concentrou-os até 10 mL para realizar as seguintes reações:

a) Reação de Baljet: Aqueceu-se 3 mL do extrato clorofórmico até resíduo e adicionou-se 4 a 5 gotas de ácido pícrico 0,5% e 2 gotas de KOH 1

N. O aparecimento da coloração alaranjada intensa é indicativo da presença de anel lactônico pentagonal.

b) Reação de Kedde: Aqueceu-se 3 mL do extrato clorofórmico até resíduo e adicionou-se 4 gotas de solução alcoólica 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 2 gotas de KOH 1 N. Coloração vermelho violácea intensa indica a presença de lactonas α , β -insaturadas.

c) Reação de Lieberman-Buchard: : Aqueceu-se 5 mL do extrato clorofórmico até resíduo e adicionou-se 0,5 mL de anidrido acético, transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 1 mL ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento da coloração castanho-avermelhada na zona de contato indica a presença do núcleo esteroidal.

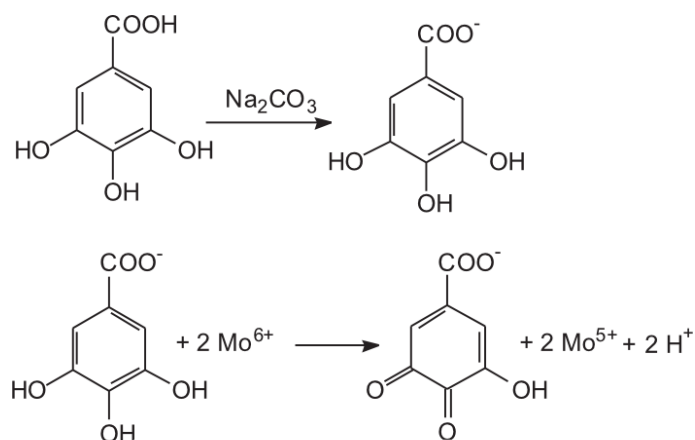
4.6 Determinação do teor de Polifenóis totais na droga vegetal

A quantificação de constituintes fenólicos totais foi realizada por espectrofotometria de absorção UV-Vis, utilizando o reagente de Folin Ciocalteu. O ensaio foi baseado em protocolo descrito por Trevisan e colaboradores (2009).

Este reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras.

Na Figura 29 está representada a desprotonação do ácido gálico em meio básico, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.

Figura 29. Desprotonação do ácido gálico em meio alcalino e posterior reação com o molibdênio presente no reagente de Folin Ciocalteu



Fonte: TREVISAN *et al.*, 2009

Construção da curva de calibração

A concentração de polifenóis totais na droga vegetal foi determinada utilizando-se uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida do padrão ácido gálico.

A curva analítica de ácido gálico foi realizada em triplicata em 3 dias diferentes. A solução estoque de ácido gálico a 1mg/mL foi preparada a partir de 10 mg da substância pura em balão volumétrico de 10mL utilizando água deionizada como solvente. Pipetou-se alíquotas de 10 μL ; 25 μL ; 50 μL ; 75 μL ; 100 μL e 125 μL desta solução estoque para ependoffs e completou-se o volume para 1 mL.

Transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL, 0,25mL das amostras contidas nos ependoffs, 4mL de água deionizada, 0,25mL de solução de Folin Ciocalteu e 0,5mL de solução de carbonato de sódio a 10%, obtendo-se soluções de ácido gálico de concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,25 $\mu\text{g/mL}$; 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 3,75 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Preparou-se um branco para cada concentração com o intuito de excluir a interferência da cor da amostra, o qual continha todos os reagentes, exceto o ácido gálico e o mesmo volume final. As soluções foram agitadas e após 25 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 760 nm.

Análise estatística

A partir das concentrações finais obtidas e das respectivas leituras de absorvância, foram construídas as curvas analíticas dos três dias diferentes. Mediante análise de covariância através do programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software, comprovou-se a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas e, assim, reuniu-se todos os dados em uma única curva analítica resultante, cuja equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

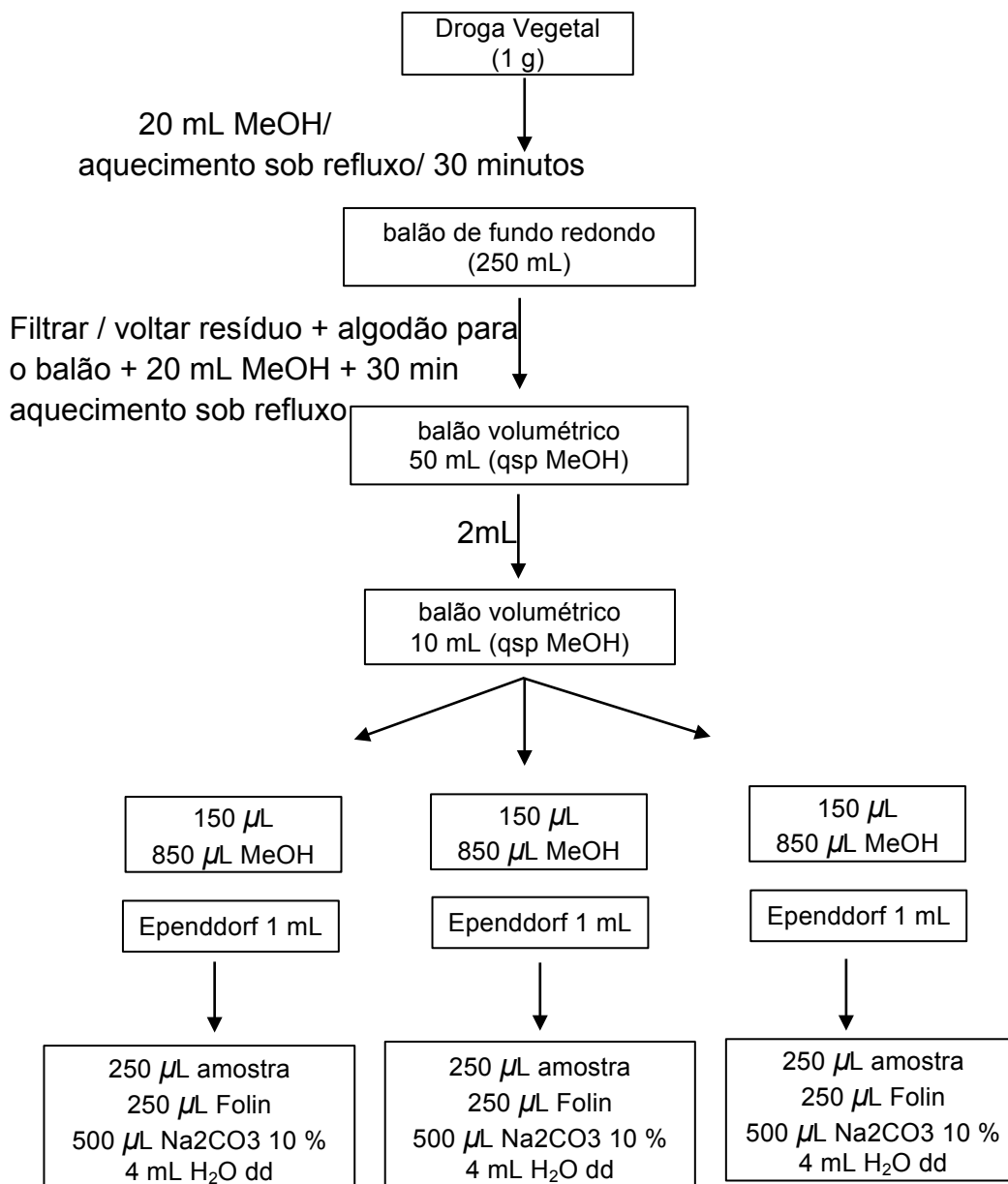
Doseamento de polifenóis totais na amostra

Para a quantificação de polifenóis totais, pesou-se 1g da droga vegetal seca e pulverizada, transferiu-se para um balão de fundo redondo de 250 mL e acrescentou-se 20 mL de metanol. O sistema foi aquecido sob refluxo durante 30 minutos. Em seguida, filtrou-se o extrato obtido, transferindo-o para um balão volumétrico de 50 mL. O resíduo vegetal foi novamente extraído com 20 mL de metanol sob refluxo, transferindo o extrato obtido para o balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução estoque de concentração da droga vegetal de 20 mg/mL.

Em seguida, diluiu-se 2 mL da solução estoque em balão volumétrico de 10 mL com metanol, obtendo-se uma solução de concentração de 4mg/mL. Transferiu-se em triplicata volumetricamente 150 μ L, 200 μ L e 250 μ L desta solução para três eppendorfs, completando-se o volume com metanol para 1 mL, obtendo-se uma concentração de 0,6 mg/mL. Em seguida transferiu-se em triplicata volumetricamente 250 μ L da solução obtida para um balão volumétrico de 5 mL acrescentando-se 250 μ L do reagente Folin, 500 μ L de solução de carbonato de sódio a 10% (p/v), completando-se o volume com água deionizada, obtendo-se uma concentração de 0,03mg/mL. Preparou-se um branco para cada concentração com o intuito de excluir a interferência da cor da amostra, o qual continha os mesmos reagentes, exceto o extrato vegetal, contendo o mesmo volume final. Agitou-se a solução obtida e após 25 minutos, realizou-se a leitura da absorvância, em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 760 nm (Figura 30). Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, mais ou menos os

desvios-padrões.

Figura 30. Representação esquemática do procedimento realizado para a quantificação de fenóis totais na droga vegetal



4.7 Determinação do teor de polifenóis não adsorvidos por caseína

na droga vegetal

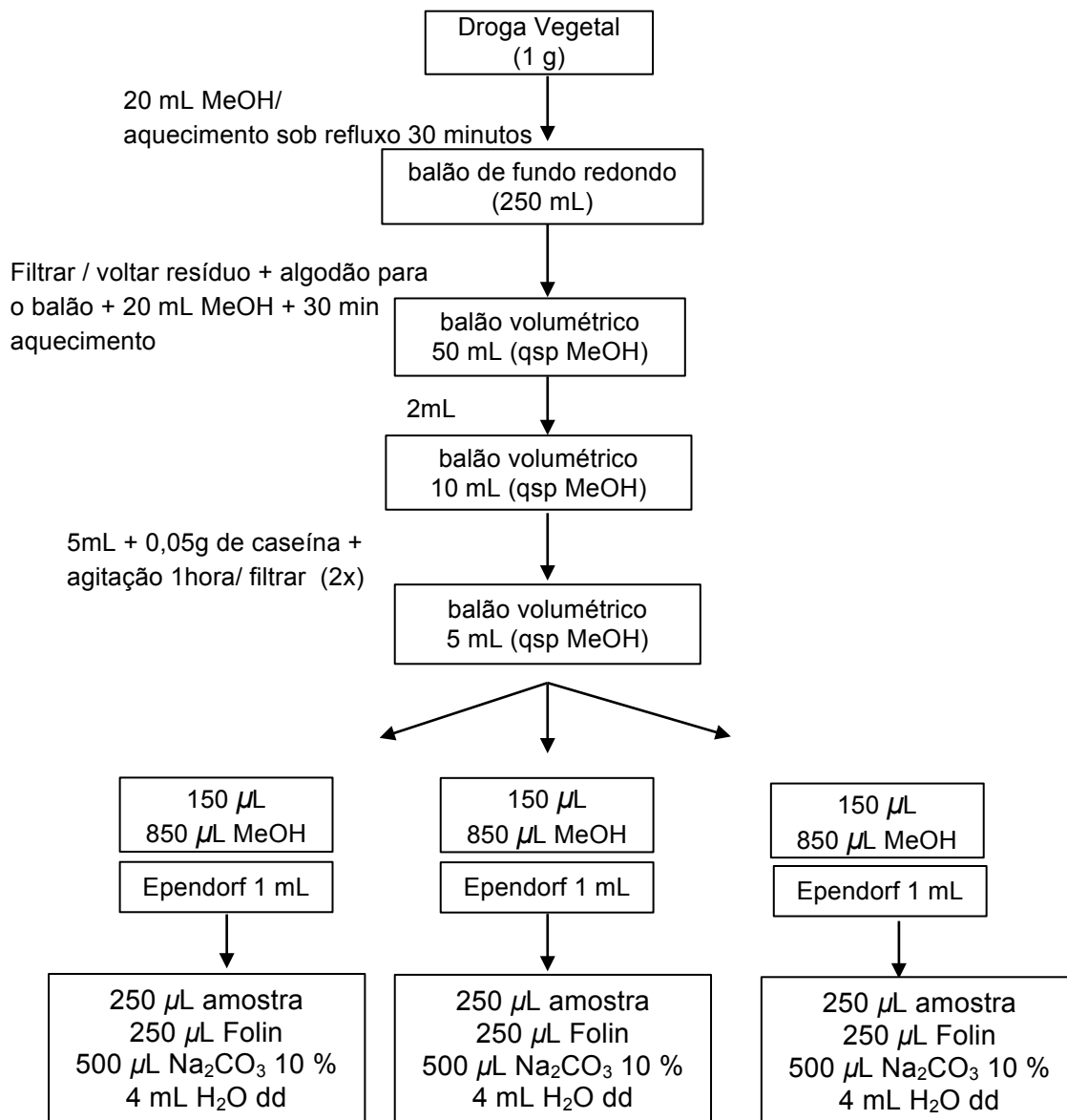
A concentração de polifenóis não adsorvidos por caseína na droga vegetal foi determinada utilizando-se a curva analítica do padrão ácido gálico obtida

no ítem anterior.

Uma alíquota de 5 mL da solução de concentração 4 mg/mL, obtida no item anterior, foi adicionada de 0,05 g de caseína, sob agitação, em recipiente fechado, durante 60 minutos. Filtrou-se a solução obtida em papel de filtro. Adicionou-se novamente 0,05g de caseína sob agitação e em recipiente fechado, durante 60 minutos. Filtrou-se a solução obtida em papel de filtro e em seguida transferiu-se o filtrado para um balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com metanol.

Transferiu-se, volumetricamente 150 μ L desta solução para tubos ependdorfs, completou-se o volume com metanol para 1 mL, para obter uma solução de concentração de 0,6 mg/mL. Em seguida transferiu-se volumetricamente 250 μ L da solução obtida para um balão volumétrico de 5 mL, acrescentou-se 250 μ L do reagente Folin, 500 μ L de solução de carbonato de sódio a 10% (p/v), completou-se o volume com água deionizada, para obter uma solução de concentração de 0,03 mg/mL. Preparou-se um branco para cada concentração com o intuito de excluir a interferência da cor da amostra, o qual continha os mesmos reagentes, exceto o extrato vegetal, contendo o mesmo volume final. Agitou-se a solução obtida e após 30 minutos, realizou-se a leitura da absorvância, em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 760 nm. O teor de taninos na droga vegetal foi obtido indiretamente pela diferença entre o teor de polifenóis totais e polifenóis não adsorvidos por caseína (Figura 31). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média das três determinações, mais ou menos os desvios-padrões.

Figura 31. Representação esquemática do procedimento realizado para a quantificação de fenóis não adsorvidos na droga vegetal

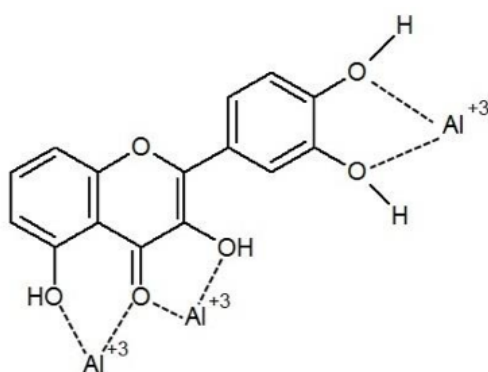


4.8 Determinação do teor de flavonoides totais expressos em quercetina na droga vegetal

A quantificação de flavonoides foi realizada por espectrofotometria de absorção UV-Vis. Os derivados flavonoídicos absorvem energia na região do UV-Vis, devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos. A

banda I (320-385nm), representa a absorção do anel B e banda II (250-285nm), corresponde à absorção do anel A. A quantificação de derivados flavonoídicos por espectrofotometria de absorção UV-Vis pode ser feita pelo método colorimétrico, o qual baseia-se na formação de complexos, de coloração amarela, entre flavonoides e íons metálicos, principalmente com o íon Al^{3+} . Os complexos estáveis formados levam à extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda. O cloreto de alumínio em solução neutra, forma complexos com três possíveis sítios quelantes: grupos 3-OH, 5-OH e 3', 4'-O-diOH, conforme esquematizado na Figura 32 (MARQUES *et al.*, 2012).

Figura 32. Esquema representativo da complexação de flavonoides com o íon Al^{3+}



Fonte: MARQUES *et al.*, 2012

A concentração de flavonoides totais na droga vegetal foi determinada utilizando-se uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida do padrão de quercetina.

Obtenção da curva de calibração com o padrão de quercetina

A curva analítica de quercetina foi realizada em triplicata em 3 dias diferentes. A solução estoque de quercetina a 0,5 mg/mL foi preparada a partir de 10 mg da substância pura em balão volumétrico de 20mL utilizando metanol P. A. como solvente. Foram pipetadas alíquotas de 0,2 mL; 0,16 mL; 0,12 mL; 0,08 mL; 0,04 e 0,02 mL desta solução estoque para balões volumétricos de 10 mL, respectivamente. Adicionou-se a cada um deles 2,0 mL de água deionizada, 240 µl

de ácido acético glacial, 4 mL de solução de piridina–metanol (20:80), e 1 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio anidro a 8% em metanol e completou-se o volume para 10,0 mL com metanol, obtendo-se soluções de concentração de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. Preparou-se um branco para cada concentração com o intuito de excluir a interferência da cor da amostra, o qual continha os mesmos reagentes, exceto a quercetina, contendo o mesmo volume final. O volume foi completado com metanol para um balão de 10 mL. As soluções foram agitadas e após 30 minutos de repouso, a temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 415 nm.

Análise estatística

A partir das concentrações finais obtidas e das respectivas leituras de absorvância, foram construídas as curvas analíticas dos dias diferentes. Mediante análise de covariância através do programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software, comprovou-se a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas e, assim, reuniu-se todos os dados em uma única curva analítica resultante, cuja equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Doseamento de flavonoides totais expressos em quercetina na amostra

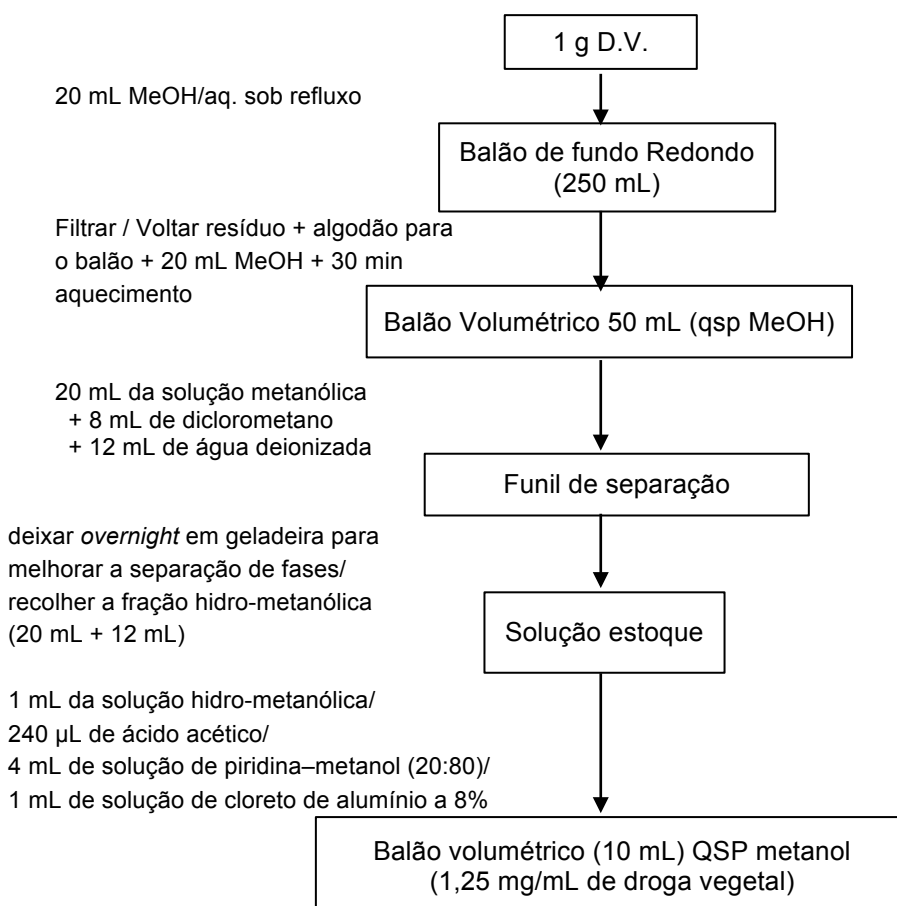
Para o doseamento de flavonoides totais, pesou-se 1 g de droga vegetal seca e pulverizada e transferiu-se para balão de fundo redondo de 250 mL. Acrescentou-se 20 mL de metanol e o sistema foi aquecido em manta aquecedora sob refluxo, por 30 minutos. Filtrou-se a mistura em algodão para um balão volumétrico de 50 mL, retornou-se com o resíduo da droga e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo e adicionou-se 20 mL de metanol. Novamente o sistema foi aquecido sob refluxo por 30 minutos. Filtrou-se a solução para o balão volumétrico de 50 mL e em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico com metanol.

Em funil de separação, adicionou-se 20 mL da solução metanólica, 8 mL de diclorometano e 12 mL de água deionizada e, após a agitação do funil de separação, com o intuito de melhorar a separação das fases aquosa e orgânica, transferiu-se a mistura para um tubo Falcon que ficou em repouso *overnight* na

geladeira. Após a separação das fases, transferiu-se a fração hidrometanólica (20 mL + 12 mL) para outro falcon, obtendo-se a solução estoque.

Uma alíquota de 1 mL da Solução estoque foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 240 μ L de ácido acético, 4 mL de solução de piridina–metanol (20:80), 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 8% (p/v) e completou-se o volume com metanol. O equipamento foi zerado com metanol. Preparou-se duas soluções branco: a solução branco 1 foi preparada adicionando-se 1 mL da solução estoque em balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 240 μ L de ácido acético, 4 mL de solução de piridina–metanol (20:80) e completou-se o volume com metanol. A solução branco 2 foi preparada para cada concentração com o intuito de excluir a interferência da cor da amostra, o qual continha os mesmos reagentes, exceto a solução hidro-metanólica, contendo o mesmo volume final. Após 30 minutos, mediu-se a absorvância da solução amostra em espectrofotômetro a 425 nm (Figura 33).

Figura 33. Representação esquemática do procedimento realizado para o desejamento de flavonoides na droga vegetal



4.9 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus*

A determinação da composição química dos óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* (OCM e OEX) foi realizada no Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (USP), com base na metodologia estabelecida por Adams (2007).

Foi utilizada a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em aparelho Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar do tipo filtro de massas. Para a dissolução da amostra foi utilizado hexano grau espectroscópico.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 μm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240°C e o volume de injeção foi de 0,1 μL . A temperatura do forno foi programada de 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C/min. Para a padronização dos tempos de retenção foi adicionada às amostras de óleos essenciais uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C8 a C20). Os índices de retenção (IR) foram calculados de acordo com a equação 1:

$$\text{IR} = 100n + 100 \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$$

Onde n é o número de carbonos do primeiro hidrocarboneto da mistura de padrões, cujo tempo de retenção t_n , é imediatamente menor que o tempo de retenção t_x do constituinte do óleo essencial, e t_{n+1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto da mistura de padrões imediatamente maior.

Os valores de IR obtidos foram comparados com os da literatura. A amostra eluída da coluna cromatográfica foi direcionada pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 280°C

e a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de m/z entre 40 e 600.

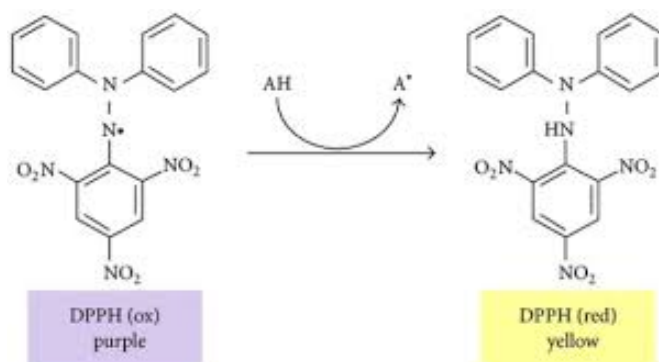
Os espectros de massas obtidos foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem.

A identificação de cada constituinte químico presente nos óleos essenciais foi feita com base na combinação entre os valores de IR e de IS. As porcentagens de cada constituinte químico nos óleos essenciais foram estimadas a partir das áreas dos picos, obtidas por normalização.

4.10 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de redução do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), com base em protocolo descrito por Takemoto e colaboradores (2009). Este método baseia-se na redução do radical DPPH, que, quando em solução, apresenta coloração violeta com forte absorção em torno de 515 a 517 nm. Ao receber um elétron ou um átomo de hidrogênio, seu elétron passa a ser pareado, tornando-se uma molécula diamagnética e a absorção característica desaparece (Figura 34). A descoloração resultante está relacionada estequiometricamente com o número de elétrons aceitos. Desta forma, a atividade antioxidante de compostos é expressa em função da capacidade de provocar um decréscimo na absorção (515 a 517 nm) de uma solução de DPPH a uma determinada concentração, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH (IC_{50}).

Figura 34. Redução do radical DPPH



Fonte: ALVES *et al.*, 2010

Preparo das amostras e do padrão

Solubilizou-se 2 mg de cada uma das amostras (OCM, OEX, extrato, frações e eugenol), em etanol, obtendo-se uma solução estoque de concentração de 1 mg/mL. Para auxiliar na solubilização dos constituintes das amostras, utilizou-se 40 μL da solução de DMSO/Tween 80 1:1 v/v.

A partir da solução estoque, preparou-se soluções testes nas concentrações de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$ por meio de diluições sucessivas (1:2, v/v) utilizando como diluente o etanol. Preparou-se um branco para cada concentração com o intuito de excluir a interferência da cor da amostra, o qual continha 500 μL de amostra e 1,5 mL de etanol.

Para o preparo da solução padrão, solubilizou-se 50 mg de ácido ascórbico em etanol. A partir da solução estoque preparou-se soluções testes nas concentrações de 0,1212 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$ por meio de diluições sucessivas (1:2 v/v) utilizando-se como diluente o etanol.

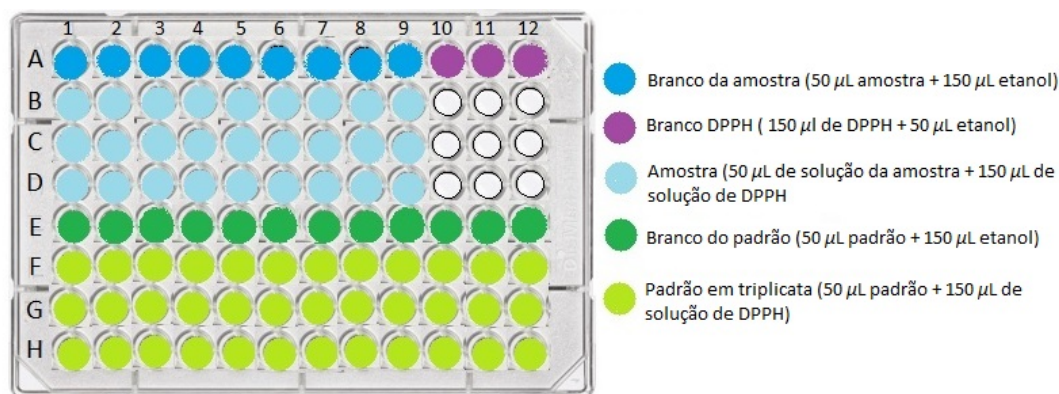
Preparo da solução de DPPH

Para o preparo da solução de DPPH, solubilizou-se 1 mg em 50 mL de etanol, obtendo-se uma solução de concentração de 0,05 mM. O branco do DPPH (controle negativo), foi preparada adicionando-se 1,5 mL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM com 500 μL de etanol.

Montagem do ensaio na microplaca

As soluções preparadas foram transferidas para uma microplaca, conforme Figura 35. Os poços da microplaca referentes ao branco da amostra continham 50 μL de solução da amostra e 150 μL de etanol. O branco do DPPH, por sua vez, era constituído de 150 μL de solução de DPPH e 50 μL de etanol. Os poços da amostra continham 50 μL de solução da amostra e 150 μL de solução de DPPH. A microplaca foi agitada em agitador de microplaca (SI-0400, Scientific Industries, EUA) por 2 minutos e incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após este tempo, a microplaca foi levada para leitor espectrofotométrico de microplaca (SpectraCount Microplate Reader, Packard, EUA) e lida em comprimento de onda fixo de 510 nm.

Figura 35. Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca



Após a leitura das absorvâncias das amostras ($n=3$), a inibição do radical DPPH foi calculada usando a equação 2:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{absorvância branco do DPPH} - \text{absorvância amostra}}{\text{absorvância do branco do DPPH}} \times 100$$

Este cálculo foi realizado para todas as concentrações da amostra (0,97 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e seus resultados foram plotados para a construção da curva analítica de % inibição *versus* a concentração da amostra (x , $\mu\text{g}/\text{mL}$). Através da equação da reta gerada, foi calculada a concentração de amostra que causou 50% de inibição (IC50), ao se substituir a incógnita y pelo valor 50.

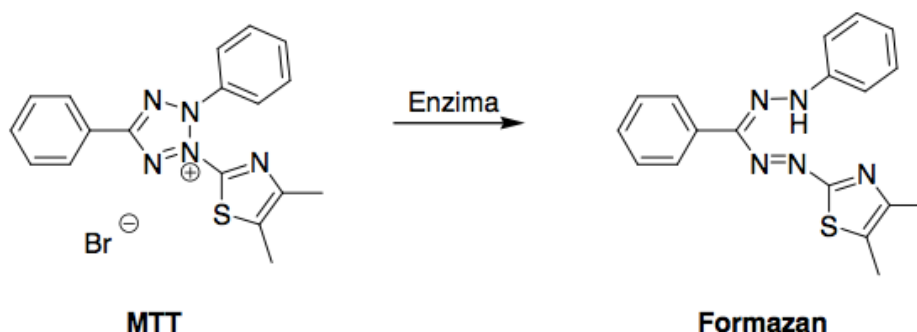
Análise estatística

Para comparações das IC_{50} das amostras analisadas, foi realizada a análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do teste de Tukey através do software SPSS versão 13.0 (IBM, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4.11 Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no laboratório de cultura de células do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS). A viabilidade das células foi avaliada realizando o ensaio do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) conforme metodologia descrita por Mosmann (1983) com adaptações. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto em estudo no metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

Figura 36. Redução do MTT a formazan



Fonte: STOCKERT *et al.*, 2012

Cultivo celular

Para a realização do ensaio de viabilidade celular foi utilizada a linhagem de fibroblasto murino (L929), a qual foi cultivada em monocamada aderente em meio de cultivo DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e ácido [4-(2-hidróxi-etil)]-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES) 10 mM. As células cultivadas foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e pH 7,4. A cada 2-3 dias, as células foram subcultivadas através da remoção de 90% do sobrenadante, o qual foi substituído por meio de cultura.

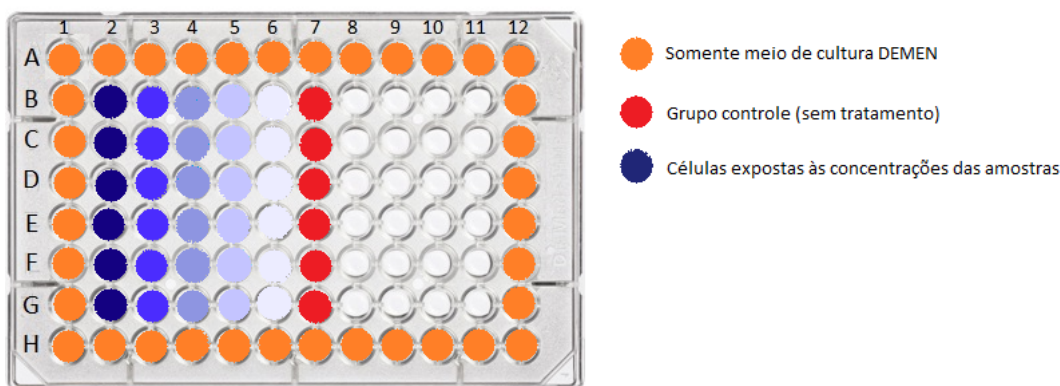
Preparo das amostras

Foram preparadas soluções nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato, em meio de cultivo DMEM, utilizando 1% de DMSO para auxiliar na solubilização. Para as demais amostras analisadas (eugenol, OEX e OCM) foram preparadas soluções de 31,5 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$, em meio de cultivo DMEM, utilizando 1% de Tween/DMSO (1:1, v/v) para auxiliar na solubilização.

Montagem do ensaio na microplaca

As células L929 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, em 100 μL de meio por poço, conforme Figura 37. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por um novo meio juntamente com a substância testada. As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO_2 durante 24 h. Foi realizada o controle sob as mesmas condições, mas sem adicionar a substância teste. Após 24 horas de tratamento, o meio foi removido, e um total de 90 mL de meio DMEM e 10 μL de MTT (mg mL^{-1}) foram adicionados seguindo-se a incubação durante 3 horas a 37°C. O precipitado formazan foi então dissolvido em DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm, utilizando-se um leitor de microplacas.

Figura 37. Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca



Calculou-se a média das absorbâncias em todas as concentrações da amostra, grupo controle e branco. Posteriormente, subtraiu-se a média das absorbâncias da amostra pela média das absorbâncias do branco. O valor obtido pela subtração da média das absorbâncias do grupo controle pela média da absorbância dos brancos foi considerado com 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular das amostras testadas foi determinada pela equação 3 a seguir:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância grupo de tratamento}}{\text{Absorbância do grupo controle}} \times 100$$

Análise estatística

Dados de viabilidade celular foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. A porcentagem de viabilidade em comparação com poços do controle (a densidade de células não tratadas foi definida como 100% de viabilidade) foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta por análise de regressão linear. Os dados de cada ensaio foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.12 Ensaio antifúngico

Linhagens fúngicas de interesse

Para a realização dos ensaios antifúngicos foram utilizadas quatro linhagens padrão de *Sporothrix* sp.: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 e *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943, gentilmente cedidas pelo laboratório de Micologia Celular e Proteômica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Também foram utilizadas no estudo duas linhagens clínicas de *Sporothrix schenckii*, denominadas genericamente como A e B, as quais foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP).

Para a manutenção das linhagens fúngicas, foram realizados repiques periódicos e sucessivos, de 30 a 40 dias. As linhagens foram cultivadas em Ágar *Sabouraud* dextrose (SDA). Foi realizada também a técnica de conservação a médio prazo, na qual as linhagens foram armazenadas em criotubos contendo água destilada estéril, sob temperatura de -20°C . Esta técnica oferece boa segurança para o armazenamento de diversos micro-organismos por períodos de 3 meses a 2 anos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

Caracterização macroscópica

A identificação das linhagens fúngicas pela caracterização macroscópica tem como fundamento a observação da morfologia da colônia. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, e pode ser feita em placa de petri contendo a cultura primária do fungo (BRASIL, 2013). Assim, as linhagens fúngicas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar *sabouraud* dextrose e incubadas a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 a 10 dias. Após o período de incubação, foram evidenciadas as características macroscópicas das linhagens fúngicas de interesse.

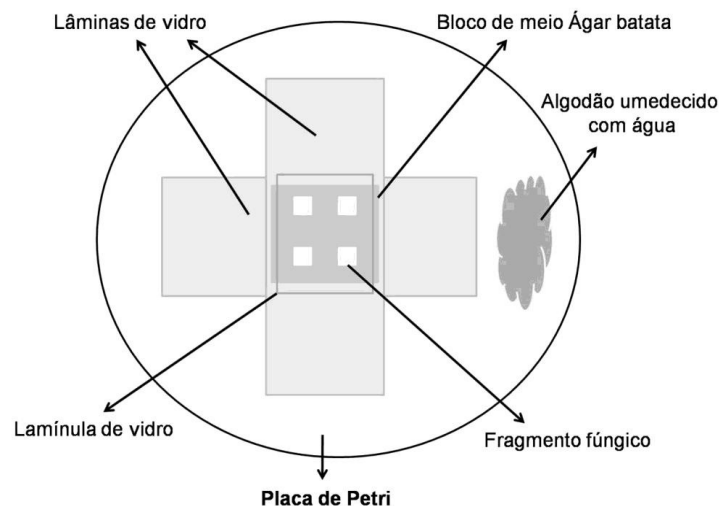
Caracterização microscópica

A caracterização microscópica, realizada com base no protocolo descrito por Pimentel e colaboradores (2010), objetiva a observação das estruturas colônia fúngica, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos. A morfologia microscópica foi analisada através da técnica

de microcultivo, que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, como esporângios e órgãos de reprodução.

O procedimento consiste no emprego de lâminas de vidro e placa de Petri esteril, um bloco de ágar batata de 1,0 cm² com 4 – 5 mm de altura e um suporte, utilizado com outra lâmina de vidro (Figura 38). Foram semeados fragmentos do fungo nos 4 lados do cubo de ágar e utilizou-se uma lamínula esteril para recobrir o ágar e os fragmentos fúngicos. Para proporcionar um ambiente úmido, adicionou-se na placa um algodão umedecido com 2 mL de água destilada esteril. Todo o sistema foi incubado em estufa a temperatura de 28± 2°C por 7 a 10 dias, para o desenvolvimento de hifas.

Figura 38. Esquema de microcultivo de lâmina em vidro



Fonte: CANESCHI, 2013.

Após o período de crescimento fúngico, retirou-se a lamínula na qual estava aderida a parte aérea do fungo. Uma gota do corante lactofenol azul de algodão foi acrescentada sobre uma lâmina, onde foi apoiada a lamínula. Com o auxílio do microscópio óptico (Eclipse-E200, Nikon, Japão), foi possível observar as estruturas de reprodução (conídios, conidióforos) e de ornamentação (hifas), as mesmas ampliadas em 40 vezes.

4.13 Determinação da CIM e CFM

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada conforme o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2008). Foram utilizadas placas estéreis de 96 poços e de fundo chato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Padronização do inóculo fúngico

O primeiro passo para a determinação da CIM foi a padronização do inóculo afim de ajustar a densidade de células do inóculo fúngico em aproximadamente $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL.

Para induzir a formação de estruturas de reprodução, as linhagens foram cultivadas em *Ágar Sabouraud* dextrose (SDA) durante 7 dias, à temperatura de 28°C. Posteriormente, foi realizada a lavagem da cultura, com 2 mL de solução salina estéril 0,9% (p/v) e 20 µL de solução Tween-80/ DMSO 1:1 v/v). Após a primeira lavagem, procederam-se mais três, somente com solução salina estéril 0,9% (p/v).

A suspensão resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio estéril. Quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo, após 3 a 5 minutos, a parte superior da suspensão foi transferida para um tubo cônico estéril e homogeneizada em um agitador de tubos durante 15 segundos.

A transmitância da suspensão fúngica foi medida no espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, UK), ajustada na faixa de 80 a 82%, empregando o comprimento de onda fixo de 530 nm. Posteriormente, esta suspensão foi diluída na proporção de 1: 50 (v/v) em meio RPMI-1640 tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS) obtendo-se a densidade desejada de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL.

O número de células viáveis da suspensão fúngica foi quantificado transferindo-se 0,01mL de uma diluição de 1:100 do inóculo padronizado, numa placa de *ágar sabouraud* dextrose para determinar o número viável de UFC por

mililitro. As placas foram incubadas a temperatura de 28 a 30°C e observadas diariamente para verificar a presença de colônias de fungos. As colônias foram contadas após o crescimento tornar-se visível.

A suspensão final preparada foi empregada para a determinação da CIM, por meio da transferência de uma alíquota de 100 μL desta suspensão para a microplaca. Todas as suspensões descritas foram utilizadas logo após o preparo das mesmas.

Preparo das amostras

No preparo da solução estoque dos óleos essenciais foram adicionados 3,39 μL de óleo; 2,82 μL de solução de Tween 80/DMSO 1:1 (v/v) e 1.493,8 μL de RPMI 1640. Na solução estoque do eugenol, foram empregados 3,03 μL do mesmo, 2,52 μL de solução de Tween 80/DMSO 1:1 (v/v) e 1.494,5 μL de RPMI 1640.

Utilizando o valor de densidade das amostras (densidade do eugenol = 1,089; densidade do OC = 0,9278 e densidade do OE = 0,922) calculou-se a concentração resultante em $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra. Obtendo-se, desta forma, soluções estoque na concentração de 2.199,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o eugenol, na concentração de 2.083,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o OE e 2.096,82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o OC.

A partir das soluções estoque, foram preparadas diluições sucessivas (1:2) v/v em meio de cultura RPMI 1640. As concentrações testadas foram de 8,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1.048,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o OC; de 8,14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1041,86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o OE; e de 8,59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1.099,89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o eugenol.

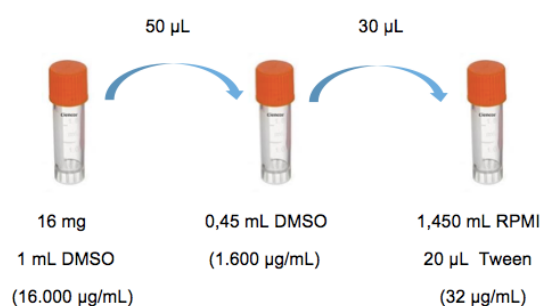
Para o ensaio com o extrato etanólico 95% (v/v) foi preparada uma solução estoque de 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para tal, 50 mg foram dissolvidos em 0,5 mL de Tween 80/DMSO (1:1) v/v, obtendo-se uma solução de concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma alíquota de 30 μL desta solução foi diluída em 1,470 mL de RPMI 1640, obtendo-se uma solução estoque de concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir das soluções estoque, foram preparadas diluições sucessivas 1:2 (v/v). As concentrações finais testadas na microplaca foram de 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Preparo das soluções dos fármacos de referência

Para o ensaio com os fármacos de referência, cetoconazol e anfotericina

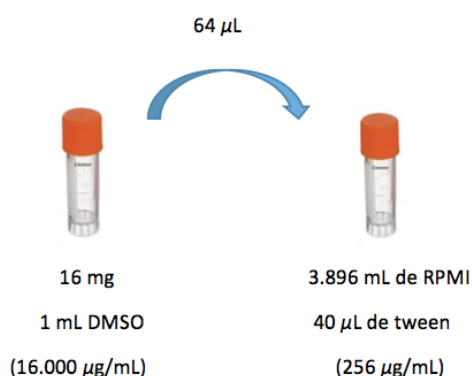
B, pesou-se 16 mg de cada um dos fármacos e dissolveu-se em 1 mL de DMSO. Uma alíquota de 50 μL foi dissolvida em 0,5 mL de DMSO. Novamente uma alíquota de 30 μL foi dissolvida em 1,450 mL de RPMI 1640 e 20 μL de Tween para auxiliar na solubilização do fármaco, resultando numa solução estoque de concentração 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conforme representado na Figura 39. A partir das soluções estoque, foram preparadas diluições sucessivas 1:2 (v/v). As concentrações finais testadas na microplaca foram de 0,0313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 39. Esquema de preparo das soluções estoque de anfotericina B e cetoconazol



Para o preparo da solução do fármaco de referência itraconazol, pesou-se 16 mg e solubilizou-se em 1 mL de DMSO. Uma alíquota de 64 μL foi transferida para um falcon, adicionou-se 3,896 mL de RPMI 1640 e 40 μL de Tween para auxiliar na solubilização do fármaco, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conforme representado na Figura 40. A partir das soluções estoque, foram preparadas diluições sucessivas 1:2 (v/v). As concentrações finais testadas na microplaca foram de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 40. Esquema de preparo da solução estoque de itraconazol



Preparo das soluções controles

Foram preparadas três soluções controles. O controle dos diluentes (DMSO e tween) foi realizado a fim de se comprovar a viabilidade fúngica dos mesmos. Para tal, 200 μL da maior concentração de diluente utilizada no teste, diluída em meio de cultura RPMI 1640 inoculado, foi incubada por 4 dias a 27°C em triplicata (Figura 41). Neste caso, deve haver crescimento fúngico a fim de se comprovar que os diluentes não interferem no crescimento fúngico.

Também foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura RPMI 1640. Para isso, 200 μL de RPMI 1640 foi incubado a 27°C por 4 dias em triplicata (Figura 41). Neste caso, não deve haver crescimento fúngico, comprovando a esterilidade do meio de cultura. O terceiro controle é para se comprovar a esterilidade da amostra. Para isso, 200 μL da menor concentração da amostra foi incubado a 27°C por 4 dias em triplicata (Figura 41). Neste caso, não deve haver crescimento fúngico, comprovando a esterilidade da amostra testada.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No preparo da microplaca foram adicionados em cada poço, 100 μL do meio RPMI 1640 inoculado com o fungo e 100 μL das soluções das amostra (Figura 41). A faixa de teste para as amostras e fármacos de referência encontram-se na Tabela 5. A microplaca foi incubada a 27°C por 4 dias. Após este período, foi realizada a interpretação do teste. A menor concentração da amostra em que não houve crescimento fúngico foi considerada o valor da CIM.

Figura 41. Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca

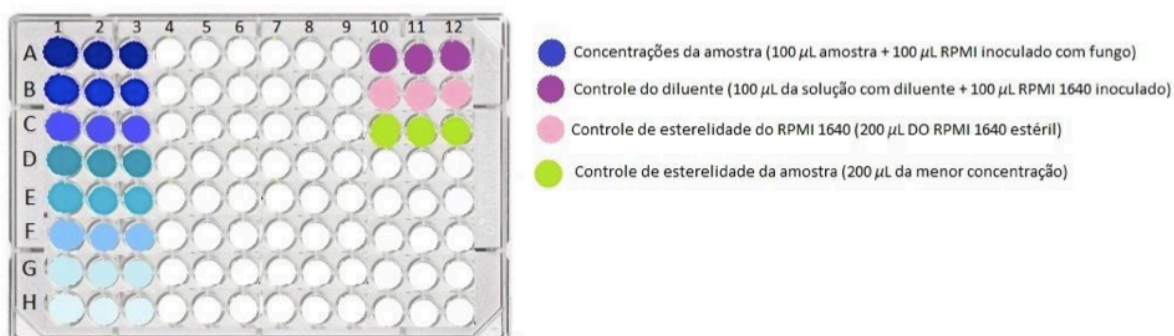


Tabela 5. Faixa de teste das amostras e dos fármacos de referência utilizados no ensaio antifúngico

Amostra	Faixa de teste ($\mu\text{g/mL}$)
eugenol	8,59 a 1.099,89
OEX	8,14 a 1.041,86
OCM	8,19 a 1.048,41
Extrato	7,8 a 1.000
anfotericina b	0,0313 a 16
cetoconazol	0,0313 a 16
itraconazol	1 a 128

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM é definida como a menor concentração da substância na qual a linhagem fúngica não apresenta capacidade de crescimento, quando inoculada em meio sem antifúngicos (RASOOLI; ABYANEH, 2004).

Após a leitura dos resultados da CIM das amostras testadas, alíquotas de 10 μL dos poços em que não apresentaram crescimento fúngico, foram retirados e semeados em placas de 96 poços, juntamente com 200 μL de SDB estéril. O sistema foi incubado por 3 dias à temperatura de 35°C.

Dessa forma, caso o crescimento fúngico ocorra após a diluição da alíquota do meio contendo o agente antifúngico, este é considerado um agente fungistático. Se não houver crescimento fúngico, é considerado um agente fungicida (MAGAGNIN *et al.*, 2011).

4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises morfológicas empregando MEV foram realizadas no Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), baseando-se em metodologia descrita por Santos (2012). Foram utilizadas as seguintes linhagens

fúngicas: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943. As linhagens foram expostas aos fármacos de referência, anfotericina B e itraconazol; aos tratamentos experimentais, OC, OE e eugenol, na concentração de duas vezes a CIM. Para o itraconazol, utilizou-se a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, pois não foi possível chegar a um valor exato de CIM.

Foi realizada a padronização fúngica da mesma forma como a descrita para a CIM e, após 7 dias de incubação a 27°C em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, as células fúngicas foram expostas às substâncias de interesse durante 7 dias a 27°C.

Após este período, as células foram acondicionadas em eppendorfs, lavadas (3x) com solução de tampão fosfato (pH = 7.4) e fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, formaldeído 4% e tampão de cacodilato 0,1 M e pH = 7,2 durante 24 horas sob refrigeração (4°C). Após a fixação, as células foram transferidas para lamínulas de vidro com polilisina e pós-fixadas por 30 minutos em 1% de tetróxido de ósmio contendo 1,25% ferrocianeto de potássio.

Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,2) e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 95%, 100%) em intervalos de 15 minutos para cada concentração. Decorrido este procedimento, foi realizado o ponto crítico (Leica EM-CPD030) e a metalização com ouro, no aparelho BALZERS UNION FL-9496. As amostras foram lidas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo 6390L).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 *Screening* fitoquímico

Os resultados do *screening* fitoquímico encontram-se descritos na Tabela 6 e foram expressos como: intenso (+ + +), médio (+ +), pouco (+), indicando a presença do metabólito secundário ou negativo (-), pela ausência de reação.

Tabela 6. *Screening* fitoquímico realizado com o extrato hidroetanólico 95% v/v das folhas de *P. pseudocaryophyllus*

metabólito secundário	reação de identificação	resultado
flavonoides	AlCl ₃	++
	H ₃ BO ₃	+++
	NaOH	+++
	<i>Shinoda</i>	+++
taninos	acetato de chumbo	+++
	acetato de cobre	+++
	sais de ferro	+++ (verde)
	sal de alcaloide	+
	gelatina	+
alcaloides	<i>Bertrand</i>	–
	<i>Bouchardat</i>	–
	<i>Dragendorff</i>	–
	<i>Mayer</i>	–
triterpenos e esteroides	<i>Baljet</i>	–
	<i>Kedde</i>	–
	<i>Lieberman-Buchard</i>	–
		–
proantocianidinas	H ₂ SO ₄	++
cumarina		–
saponina		–

O *screening* fitoquímico possibilitou a identificação da presença de flavonoides, taninos e proantocianidinas. Na reação de identificação de taninos com sais de ferro foi observada a formação de precipitado verde, sugerindo a presença de taninos condensados.

Os taninos condensados e as proantocianidinas são provenientes da hidroxilação de uma flavanona, gerando flavan-3-ol e/ ou flavan-3,4-diol. Dessa forma, taninos condensados e flavonoides são provenientes das mesmas rotas biossintéticas (rota do chiquimato e rota do acetato), o que sugere a preponderância da expressão destas enzimas nas rotas metabólicas na espécie em questão.

Investigações fitoquímicas envolvendo a espécie *P. pseudocaryophyllus* têm se limitado, em grande parte, ao estudo dos óleos essenciais, sendo escassos os trabalhos que abordem outras classes de metabólitos secundários.

Paula e colaboradores (2006), identificaram flavonoides e taninos, em estudo de prospecção fitoquímica, realizado com o extrato etanólico, obtido a partir da casca de *P. pseudocaryophyllus*, coletadas no município de São Gonçalo do Abaeté-MG.

Em estudo posterior (Paula e colaboradores, 2008), resultado semelhante foi obtido na prospecção fitoquímica realizada a partir do extrato etanólico das folhas de *P. pseudocaryophyllus* coletadas em duas localidades: Brasília-DF e São Gonçalo do Abaeté-MG. Em ambas, pode-se constatar evidente presença de flavonóides e taninos, além de traços de heterosídeos antraquinônicos.

A presença de triterpenos pentacíclicos, tais como: lupeol, α -amirina, β -amirina, ácido oleanólico, ácido betulínico e ácido ursólico, foi também relatada por Paula e colaboradores (2012), em um estudo fitoquímico feito a partir do extrato etanólico bruto das folhas de *P. Pseudocaryophyllus* coletadas em São Gonçalo do Abaeté-MG. Foram também identificados neste estudo, flavonoides (quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O- β -glucopiranosídeo, canferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O- α -arabinofuranosídeo, quercetina 3-O- α -arabinopiranosídeo, quercetina 3-O- β -arabinopiranosídeo e catequina), ácido gálico e ácido elágico (PAULA *et al.*, 2012).

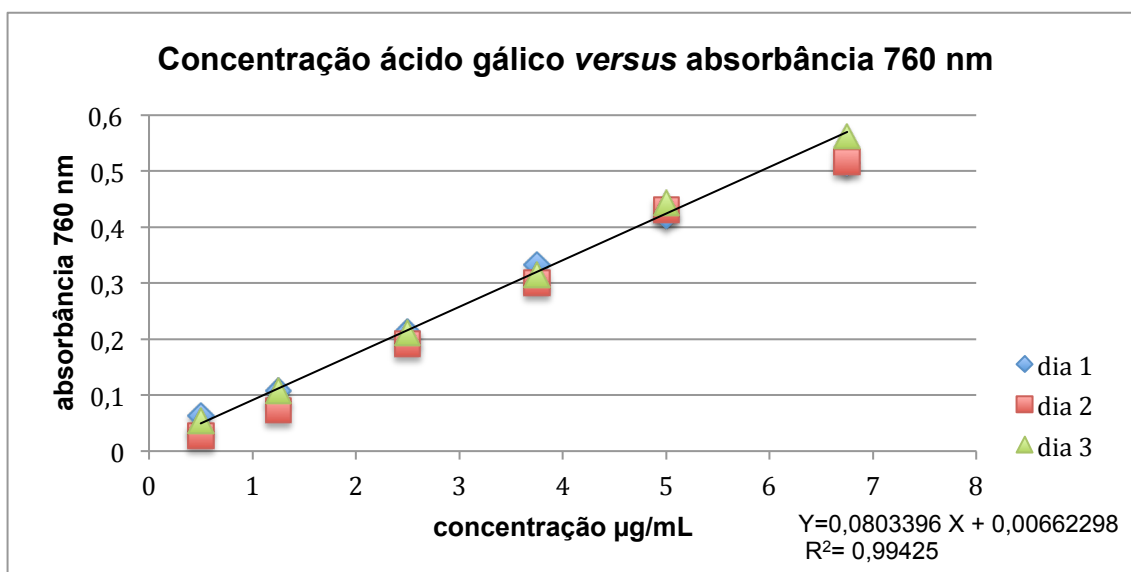
Não foram identificados no *screening* fitoquímico alcaloides, triterpenos, esteróides, cumarinas e saponinas. A ausência de positividade para estas reações sugere baixos teores para detecção qualitativa do metabólito secundário, ou mesmo, ausência destes constituintes no extrato etanólico de *P. pseudocaryophyllus*.

Além disso, deve-se considerar os diversos fatores que influenciam no metabolismo secundário de plantas. A época de coleta é um dos fatores de maior importância, visto que o teor e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. A idade e o desenvolvimento da planta, a intensidade e quantidade de incidência luminosa as quais a planta está susceptível, além de fatores mecânicos, tais como ferimentos, estímulos causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, podem influenciar a expressão do metabolismo secundário (SIMÕES *et al.*, 2004).

5.2 Quantificação de fenóis totais, taninos e flavonoides na droga vegetal

Para a quantificação de fenóis totais e taninos, foi obtida a curva analítica com o padrão de ácido gálico, sendo os dados submetidos à análise de regressão linear para obtenção da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2) (Figura 42). A escolha do ácido gálico como padrão justifica-se pelo fato do mesmo ter sido isolado em um estudo fitoquímico das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, conduzido por Paula e colaboradores (2012).

Figura 42. Curva analítica obtida a partir de soluções de concentração conhecida do padrão de ácido gálico *versus* absorvância



A partir da equação da reta ($Y=0,0803396 X + 0,00662298$) e das absorbâncias obtidas com a leitura das amostras, calculou-se o teor de fenóis totais em porcentagem em relação a droga vegetal (g/100g de droga vegetal). Os valores de absorbância obtidos para as réplicas, bem como o teor de fenóis totais, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Teor de polifenóis totais encontrados nas folhas de *P. pseudocaryophyllus*

Amostra (Droga vegetal)	Concentração (mg/mL droga vegetal)	Absorbância (730 nm)	Fenóis totais expressos em $\mu\text{g/mL}$	Concentração fenóis totais expressos em %
Réplica A	0,03	0,451	5,5312	18,43
Réplica B	0,03	0,475	5,8299	19,43
Réplica C	0,03	0,452	5,5436	18,47
Média	0,03	0,459	5,6349	18,77
Desvio padrão	-	-	$\pm 0,1689$	-

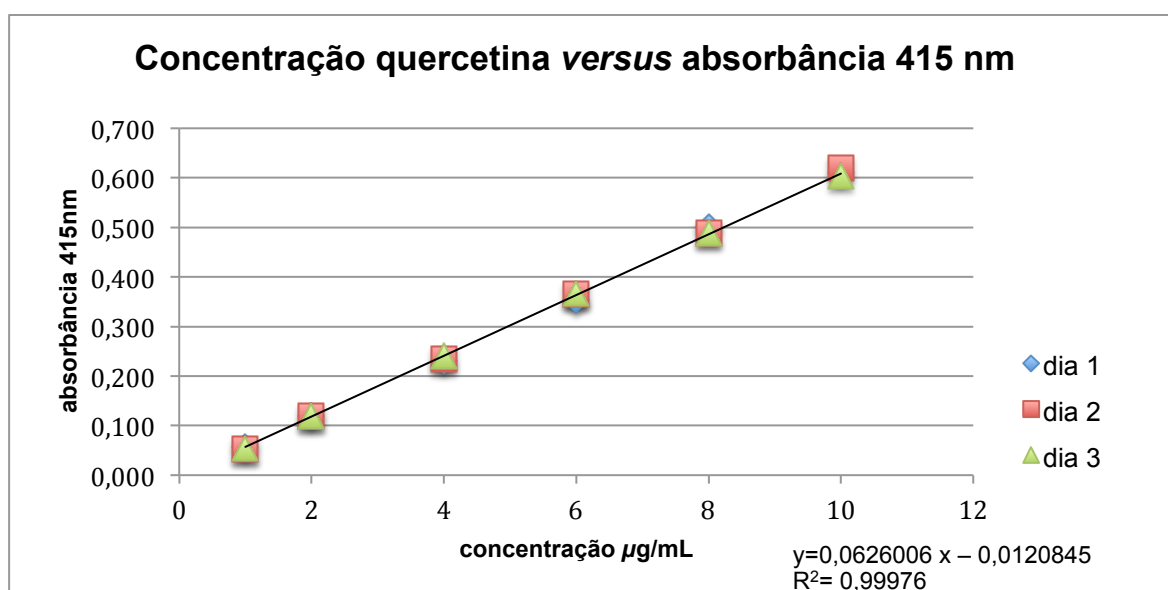
O teor de taninos na droga vegetal foi obtido indiretamente pela diferença entre a absorbância obtida para os polifenóis totais e a absorbância obtida para os polifenóis não adsorvidos por caseína. A partir da equação da reta e dos valores de absorbâncias resultantes da subtração, foram calculados os teores de taninos. Os resultados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8. Teor de tanino encontrado nas folhas de *P. pseudocaryophyllus*

Amostra (Droga vegetal)	Concentração (mg/mL droga vegetal)	Absorbância (730 nm)	Taninos expressos em $\mu\text{g/mL}$	Taninos expressos em %
Réplica A	0,03	0,263	3,1911	10,63
Réplica B	0,03	0,272	3,3031	11,01
Réplica C	0,03	0,258	3,1289	10,43
Média	0,03	0,264	3,2077	10,69
Desvio padrão	-	-	$\pm 0,0882$	-

Para a quantificação dos teores de flavonoides totais, inicialmente, foi construída a curva analítica com o padrão de quercetina, na qual os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2) (Figura 43). A escolha da quercetina como padrão justifica-se pelo fato da mesma ter sido isolada a partir das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, conforme relatam Paula e colaboradores (2012).

Figura 43. Curva analítica obtida a partir de soluções de concentração conhecida do padrão de quercetina *versus* absorbância



Os teores de flavonoides, equivalentes à quercetina, foram calculados a partir da equação da reta obtida ($y = 0,0626006 x - 0,0120845$) e dos valores de absorbância lidos. Os resultados expressos em porcentagem em relação ao peso (g/100g) de droga vegetal, estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Teores de flavonoides, equivalentes à quercetina, encontrados nas folhas de *P. pseudocaryophyllus*

Amostra (Droga vegetal)	Concentração (mg/mL droga vegetal)	Absorbância (415 nm)	Concentração flavonoides totais ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração flavonoides totais (%)
Réplica A	1,250	0,435	6,7557	0,5404
Réplica B	1,250	0,435	6,7557	0,5404
Réplica C	1,250	0,409	6,3404	0,5072
Média	1,250	0,426	6,6172	0,5293
Desvio padrão	-	-	$\pm 0,2397$	-

As folhas de *P. pseudocaryophyllus* analisadas neste estudo apresentaram elevado teor de compostos fenólicos totais (18,77%), além de valores consideráveis de taninos (10,69 %). Dessa forma, verifica-se que grande parte dos fenólicos encontrados para esta espécie são taninos, o que indica esta classe de constituintes como sendo os principais compostos fenólicos presentes na espécie.

Resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo estão descritos na literatura. Paula e Colaboradores (2008), encontraram altos percentuais de fenóis totais nas folhas de *P. pseudocaryophyllus* coletadas em São Gonçalo do Abaeté-MG (9,77% p/p) e Brasília-DF (10,52% p/p) e quantidades consideráveis de taninos totais: 15,41% (São Gonçalo do Abaeté-MG) e 14,84% (Brasília-DF).

Os valores encontrados para o teor de flavonoides, estão de certa forma de acordo com aqueles descritos na literatura, já que Paula e colaboradores (2008) descrevem um teor de 1,07% p/p e 1,37% p/p para as espécies coletadas em São Gonçalo do Abaeté-MG e Brasília-DF, respectivamente.

Já em estudo realizado por Paula e colaboradores (2006), feito com a casca de *P. pseudocaryophyllus*, coletadas em São Gonçalo do Abaeté-MG, foi relatado 6,00% (p/p) de fenóis totais, 6,08% (p/p) de taninos representando praticamente a totalidade de fenóis encontrados na casca, e foi relatado 0,045% (p/p) de flavonoides totais expressos como hiperosídeo.

A descrição quanto aos teores de polifenóis totais, taninos e flavonoides, aliados aos dados da literatura, é um importante passo para que parâmetros de

controle de qualidade possam ser estabelecidos para a espécie *P. Pseudocaryophyllus*.

5.1 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

A caracterização química do OEX de *Pimenta pseudocaryophyllus* feita por CG-EM, possibilitou a identificação de 22 constituintes. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 44; os componentes identificados e quantificados estão descritos na Tabela 10 e a estrutura dos principais constituintes do OEX estão na Figura 45.

Figura 44. Cromatograma do OEX, obtido por CG-EM

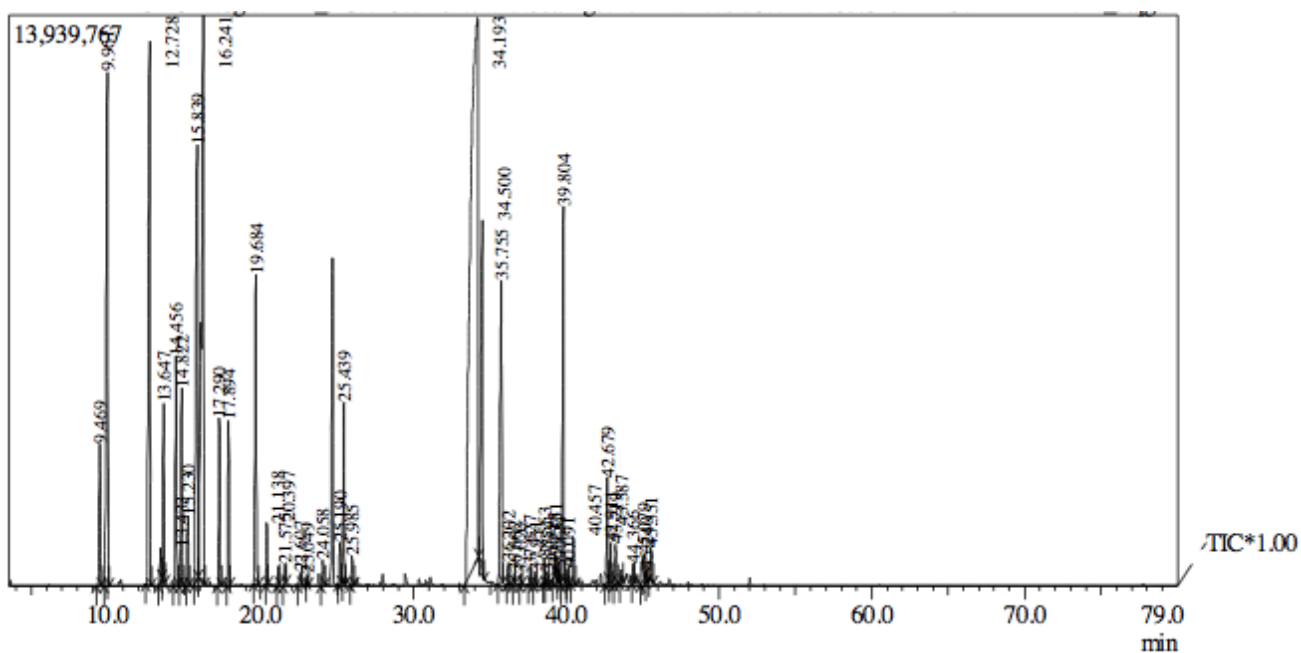


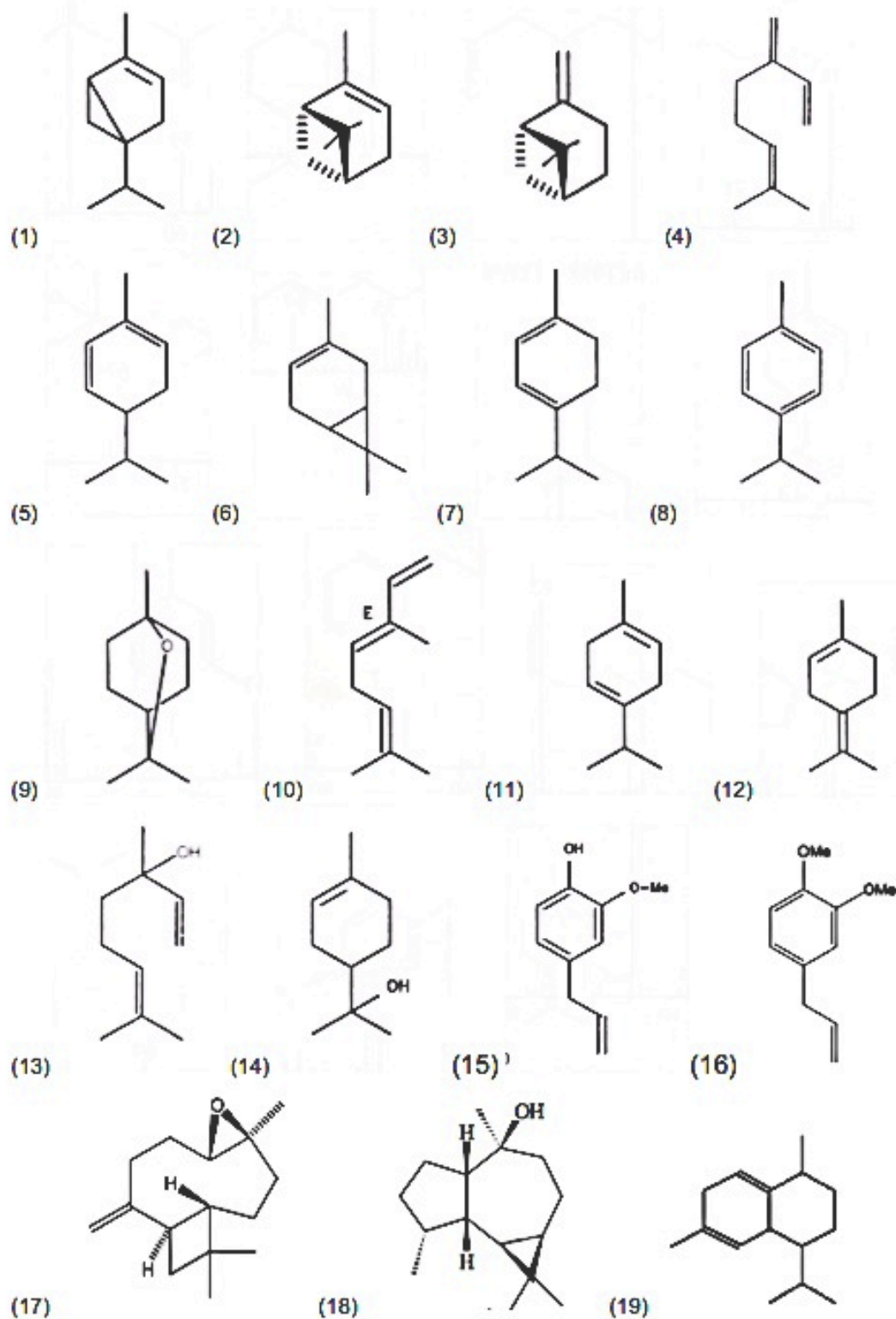
Tabela 10. Principais constituintes identificados e quantificados no OEX

Pico	TR	IR _{calc}	IR _{Lit}	Constituinte	Porcentagem	IS
1	9.469	925	927	α -Tujeno	1,47	98
2	9.961	933	933	α -pineno	7,01	98
3	12.728	977	978	β -pineno	7,79	98
5	13.647	991	988	Mirceno	1,70	97
6	14.456	1004	1003	α -phelandreno	2,42	98
7	14.822	1010	1009	δ -3-carene	1,99	97
8	15.230	1017	1015	α -terpineno	0,685	94
9	15.839	1027	1024	<i>p</i> -cimeno	6,548	96
10	16.241	1033	1032	1,8-cineol	10,86	97
11	17.290	1050	1050	(E)- β -ocimeno	1,54	94
12	17.894	1060	1058	γ -terpineno	1,56	97
13	19.684	1089	1086	terpinoleno	3,54	97
14	20.397	1101	1097	linalol	0,53	95
20	25.190	1189	-	não identificado	0,447	-
21	25.439	1193	1195	α -terpineol	1,72	94
23	34.193	1358	1359	eugenol	34,38	93
24	34.500	1385	-	não identificado	4,78	-
25	35.755	1414	1407	metil eugenol	4,50	91
36	39.804	1512	1504	α -(E)-farneseno	3,79	94
38	40.457	1529	1526	(E)-cadina-1,4-dieno	0,42	84
39	42.679	1586	1587	óxido de cariofileno	0,94	85
40	42.911	1592	1589	globulol	0,37	83
41	43.219	1599	1594	viridiflorol	0,51	85
44	45.079	1650	1650	α -muurolol	0,42	91

TR: Tempo de retenção. **IR_{Calc}:** índice de retenção calculado conforme equação 1.

IR_{Lit}: índice de retenção da literatura. **IS:** índice de similaridade.

Figura 45. Estrutura química dos principais constituintes de OEX



(1) α -Tujeno (2) α -pineno (3) β -pineno (4) mirceno (5) α -phelandreno (6) δ -3-carene (7) α -terpineno (8) *P*-cimeno (9) 1,8-cineol (10) (*E*)- β -ocimeno (11) γ -terpineno (12) terpinoleno (13) linalol (14) α -terpineol (15) eugenol (16) Metil eugenol (17) Óxido de cariofileno (18) Viridiflorol (19) (*E*)-cadina-1,4-dieno.

A caracterização química do OCM de *Pimenta pseudocaryophyllus* feita por CG-EM, possibilitou a identificação de 12 constituintes. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 46; os componentes identificados e quantificados estão descritos na Tabela 11 e a estrutura dos principais constituintes do OCM estão na Figura 47.

Figura 46. Cromatograma do OCM obtido por CG-EM

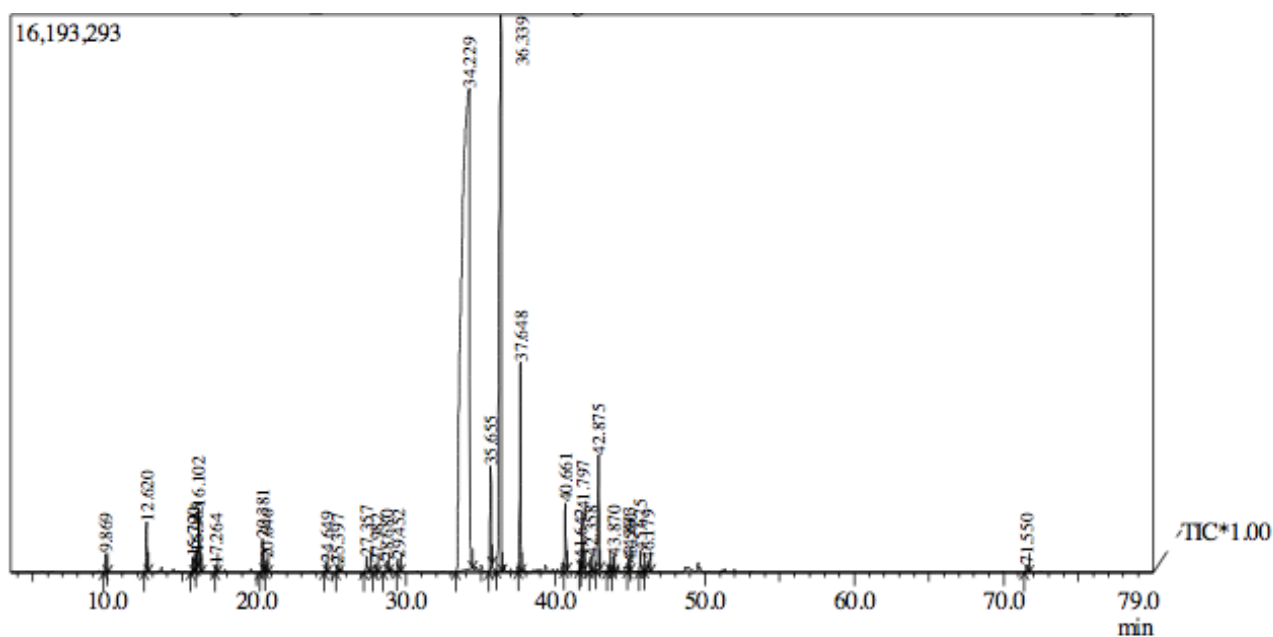
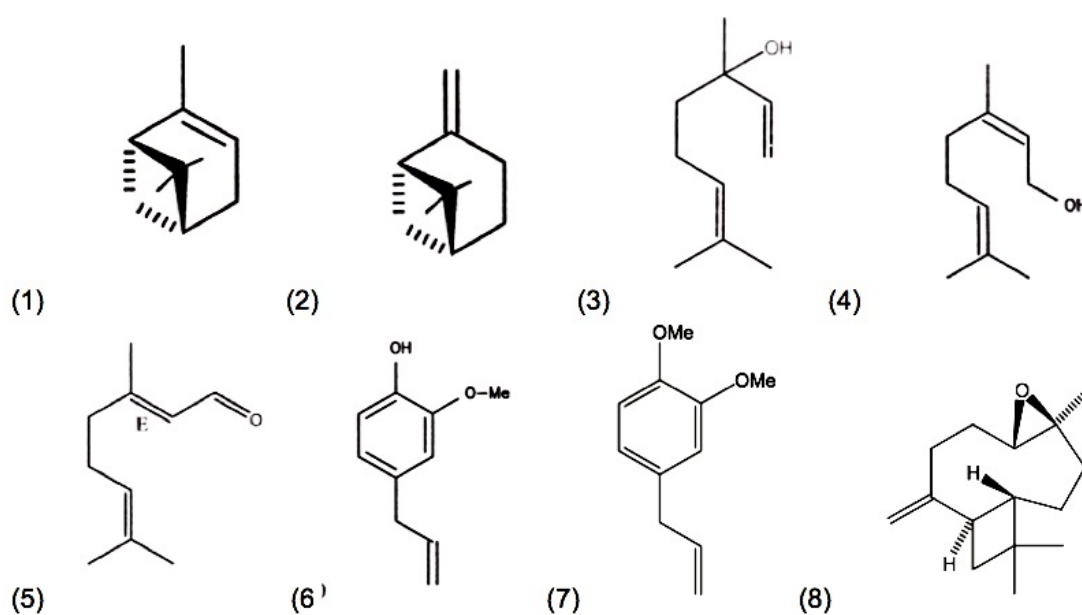


Tabela 11. Constituintes identificados e quantificados no OCM

Pico	TR	IR _{calc}	IR _{Lit}	Constituinte	Porcentagem	IS
1	9.869	931	933	α -pineno	0,38	97
2	12.620	975	978	β -pineno	1,01	98
7	20.381	1101	1097	linalol	0,62	96
11	27.183	1228	1230	nerol	0,37	89
14	29.452	1274	1268	geranial	0,31	94
15	34.229	1359	1357	eugenol	66,93	93
16	35.655	1411	1405	metil eugenol	1,87	86
17	36.339	1428	1425	4,8- β -epóxi-cariofileno	19,60	91
18	37.648	1459	1454	α -humuleno	1,94	95
19	40.661	1534	1538	dihidro-acetato de eugenol	1,25	85
21	41.797	1563	-	não identificado	1,04	-
23	42.875	1586	1587	óxido de cariofileno	2,44	93
27	45.675	1666	1670	epi- β -bisabolol	0,41	84

TR: Tempo de retenção. **IR_{calc}:** índice de retenção calculado conforme equação 1.

IR_{Lit}: índice de retenção da literatura. **IS:** índice de similaridade.

Figura 47. Estrutura química dos principais constituintes do OCM

(1) α -pineno (2) β -pineno (3) linalol (4) Nerol (5) Geranial (6) Eugenol (7) Metil eugenol (8) Óxido de cariofileno.

A análise por CG-EM do OEX permitiu a identificação de vinte e dois constituintes, perfazendo um total de 94,36% de constituintes identificados. Deste total, 48,83% são monoterpenos (α -Tujeno, α -pineno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, δ -3-carene, α -terpineno, *p*-cimeno, 1,8-cineol, β -(E)-ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, α -terpineol); 39,08% são fenilpropanóides (eugenol e metil-eugenol); e 6,45% são sesquiterpenos (α -(E)-farneseno, (E)-cadina-1,4-dieno, óxido de cariofileno, globulol, viridiflorol, α -muurolol). A intensidade dos picos indicou como componente majoritário o eugenol (34,38%).

A análise do OCM permitiu a identificação de 12 constituintes, totalizando 98,38% de constituintes identificados, sendo 2,69% monoterpenos (α -pineno, β -pineno, linalol, nerol, geranial), 70,05% fenilpropanóides (eugenol, metil eugenol e Dihidro-acetato de eugenol) e 25,64% sesquiterpenos (4,8- β -epóxi-cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno e epi- β -bisabolol). A intensidade dos picos indica como componente majoritário o eugenol (66,93%).

Os constituintes encontrados em ambos os óleos, embora em proporções diferentes, foram: α -pineno, β -pineno, linalol, eugenol, metil eugenol e óxido de cariofileno.

Considerando a análise espectrométrica realizada, na Figura 48 e 49 encontram-se os espectros de massas do eugenol, obtidos para o OEX e OCM respectivamente.

Figura 48. Espectro de massas obtido para o eugenol, a partir do OEX, por GC-EM

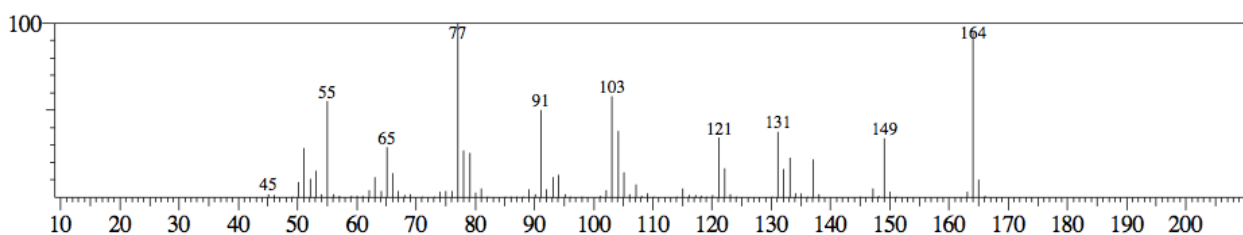
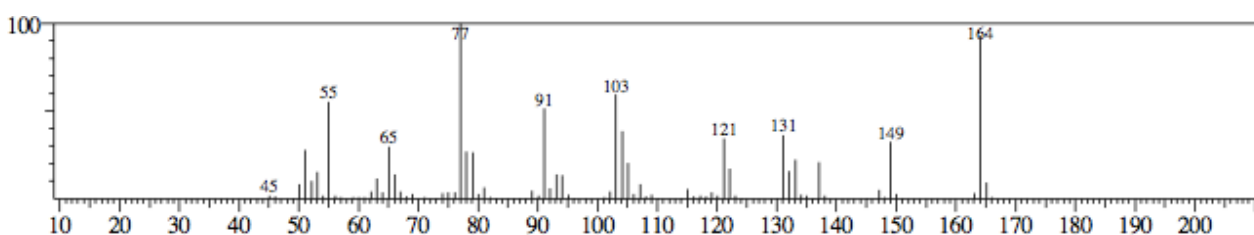


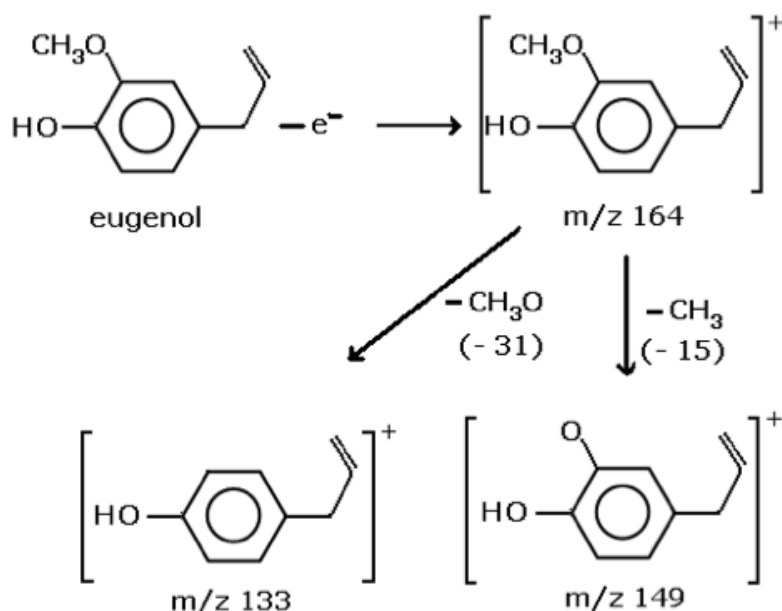
Figura 49. Espectro de massas obtido para o eugenol, a partir do OCM, por CG-EM



Segundo consta na literatura, fenóis apresentam um pico intenso correspondente ao íon molecular, o que facilita sua identificação. Observando-se as Figuras 48 e 49, nota-se um pico intenso com m/z 164 $[M^+]$, que é correspondente ao peso molecular do eugenol, confirmando a presença majoritária do mesmo no OEX e OCM (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os espectros mostraram ainda picos típicos da quebra de fenóis e éteres aromáticos, sendo que o pico m/z 149 $[M - 15]$ é característico da perda do radical metila e os picos m/z 77 e m/z 65 são correspondentes, respectivamente, aos íons $[C_6H_5^+]$ e $[C_5H_5^+]$ originados por rearranjo, com a saída do grupo CO. Já o fragmento com pico em m/z 133 $[M - 31]$ é referente à perda do grupo OCH_3 do éter (CORTEZ *et al.*, 1998; SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A Figura 50 ilustra a proposta de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol (CORTEZ *et al.*, 1998; REIBEIRO, 2009).

Figura 50. Proposta de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol



Fonte: SILVERSTEIN *et al.*, 2007

O fenilpropanóide eugenol tem sido descrito como constituinte majoritário da espécie em questão por alguns autores, principalmente, em estudos com espécimes coletadas em regiões próximas a Guaraqueçaba-PR, região onde foi

coletada a planta em estudo, as quais, devido a proximidade geográfica, estão expostas a condições edafoclimáticas semelhantes. Estudo desenvolvido por Custódio e colaboradores (2010) com o óleo essencial da espécime coletada em São Jerônimo da Serra, no Paraná, obteve como constituinte majoritário o eugenol (92%) (CUSTÓDIO *et al.*, 2010). Lima e colaboradores (2006) também encontraram resultado semelhante para o óleo essencial da espécime coletada na Ilha do Cardoso em São Paulo, a qual também apresentou como principal componente o eugenol (71,9%) (LIMA *et al.*, 2006).

Registros na literatura sobre o óleo essencial de *P. Pseudocaryophyllus* revelam diferentes composições para os óleos de espécimes coletadas em diferentes localidades. A análise do óleo essencial de espécime coletada em Campos do Jordão-SP, identificou o geranial (34,26%) e o neral (27,85%) como constituintes principais (SAKITA *et al.*, 1994); enquanto que o óleo essencial de espécime coletada em Paranapiacaba, também no estado de São Paulo, apresentou como constituinte majoritário o 4-metileugenol (94,6%) (LIMA *et al.*, 2006). Paula e colaboradores (2009) também relataram a ocorrência de uma população contendo metileugenol como componente majoritário numa região de cerrado no Planalto Central (Brasília-DF). Recentemente, um estudo com uma população de restinga na Ilha Comprida no estado de São Paulo, indicou a presença do chavibetol, um isômero de posição do eugenol, como componente majoritário do óleo essencial de *P. Pseudocaryophyllus* (SANTOS, 2009).

Diante da grande variabilidade observada na composição química do óleo essencial desta espécie, estudos têm sugerido a ocorrência de diferentes quimiotipos de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Paula *et al.*, 2010; Paula *et al.*, 2011).

Paula e colaboradores (2011) realizaram a análise qualitativa e quantitativa por CG-EM dos óleos voláteis de doze espécimes de *P. Pseudocaryophyllus* que ocorrem naturalmente em três locais diferentes na região do Cerrado brasileiro (São Gonçalo do Abaeté-MG, São José do Barreiro-MG e Brasília-DF). Neste estudo, foi analisado o padrão de variabilidade infraespecífica nos indivíduos desta espécie. Assim, três quimiotipos foram observados: o quimiotipo I, caracterizado por grandes quantidades de monoterpenos oxigenados (geranial, neral, óxido de cariofileno, e espatulenol); o quimiotipo II, caracterizado por um elevado teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos ((E)-asarone (E)-cariofileno, e elemicina) e o quimiotipo III caracterizado por uma quantidade substancial de fenóis

e (E) metil isoeugenol. Também foi observado no estudo a ocorrência de pequenas quantidades do principal componente do quimiotipo III, o (E)-metiliseoeugenol, em 11 das 12 espécimes analisadas. Os autores concluíram que apesar de fatores edáficos e fisiológicos serem importantes para a determinação da composição química dos óleos essenciais, a variabilidade química observada no estudo, indica que os fatores genéticos contribuem para o polimorfismo químico encontrado em plantas dessa espécie, e que a informação genética para a síntese de fenilpropanóides parece estar presente na maioria das amostras, independentemente do quimiotipo (PAULA *et al.*, 2011).

Estes dados justificam o fato de que a maior parte dos principais constituintes encontrados nos óleos essenciais de *P. pseudocaryophyllus* sejam derivados de fenilpropanóides, os quais são formados a partir do ácido chiquímico. Isto sugere a preponderância da expressão gênica de enzimas envolvidas neste percurso metabólico. Nos vegetais, os fenilpropanóides desempenham um papel preponderante na defesa contra insetos, herbívoros e contra fungos (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Apesar do resultado obtido por Paula e colaboradores (2011), há provavelmente outros quimiotipos de *P. Pseudocaryophyllus*, um vez que chavibetol e metileugenol (SANTOS *et al.*, 2009; RIBEIRO, 2013), assim como eugenol e metileugenol (LIMA *et al.*, 2006), foram relatados como os principais constituintes do óleo essencial de *P. Pseudocaryophyllus* em outros estudos. Foi verificado no presente estudo, que as espécimes analisadas pertencem ao quimiotipo do eugenol.

Na família Myrtaceae, a variabilidade química tem sido observada em várias espécies, incluindo *Melaleuca alternifolia*, *Eugenia brasiliensis* e *Pimenta racemosa* (ABAUL *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2002; FISCHER *et al.*, 2005).

Embora seja determinada geneticamente, a composição química dos óleos essenciais também pode variar significativamente em função de fatores ambientais. Variáveis ambientais incluindo a temperatura, o regime de chuvas, a duração e a hora do dia, o tempo de exposição e a intensidade de luz, a estação do ano e a altitude, além de fatores ecológicos e ontogenéticos, podem fazer com que a composição química, bem como a quantidade de princípios ativos produzidos pelas plantas sofram alterações (DUNIAU, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2004).

O ambiente físico desempenha papel preponderante no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Ao longo de um ano, ocorrem flutuações na

pluviosidade, na radiação solar e na temperatura que podem promover alterações no metabolismo vegetal. As mudanças envolvem desde as taxas fotossintéticas, até a síntese de metabólitos secundários, uma vez que a disponibilidade de recursos promove efeitos regulatórios na atividade das enzimas chaves de suas rotas biossintéticas (DUNIAU, 2003). A atividade da enzima responsável pela síntese dos precursores fenilpropanoídicos, fenilalanina amônia liase, têm sua atividade modificada pela temperatura, pela disponibilidade hídrica e pela luminosidade (CASTRO *et al.*, 2005).

Por esta razão, a sazonalidade é um fator fundamental a ser considerado quando se trata da variabilidade química de óleos voláteis. Alterações na composição do óleo obtido em diferentes épocas do ano foram demonstradas para muitas espécies. Em estudo realizado por Ribeiro (2013), foi investigado o efeito da sazonalidade sobre metabólitos voláteis de *P. pseudocaryophyllus*. Maiores teores dos constituintes majoritários chavibetol e metileugenol foram encontrados nos meses de janeiro (69,1% e 20,7% respectivamente) e novembro (70,9% e 20,7% respectivamente) (RIBEIRO, 2013).

Variabilidades no teor e na composição de óleos voláteis observadas em diferentes populações de uma determinada espécie englobam muitos aspectos. A dissociação entre o componente genético e a influência das características ambientais não é simples e requer estudos mais profundos e com uma equipe multidisciplinar de pesquisadores (LEE *et al.*, 2002).

Um dos caminhos para a verificação da importância do componente genético na variabilidade química do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* seria propagar e cultivar, sob as mesmas condições, plantas de cada quimiotipo a partir dos espécimes nativos, e analisar, após o tempo necessário, a composição dos óleos essenciais de suas folhas. A semelhança entre a composição química dos espécimes cultivados e nativos indicaria uma predominância do controle genético.

A composição química dos óleos essenciais contribui significativamente para a determinação do potencial farmacológico atribuído às espécies vegetais. É importante caracterizar e identificar a existência de quimiotipos em plantas aromáticas, especialmente quando se trata de material botânico para estudos químicos, farmacológicos e agrônômicos visando a produção de fitoterápicos (POTZERNHEIM; BIZZO; VIEIRA, 2006).

5.5 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi expressa em termos de concentração inibitória mínima em 50% (CI_{50}), ou seja, como a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a ação oxidante do DPPH. A média dos valores de $CI_{50} \pm$ o desvio padrão para cada uma das amostras estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de atividade antioxidante, expressos em CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$, encontrados para as amostras e padrão

Amostra	Atividade Antioxidante (CI_{50}, $\mu\text{g/mL}$)
Ácido ascórbico (padrão)	$1,87 \pm 0,01^a$
Extrato etanólico bruto	$5,65 \pm 0,44^{b,c,d,e}$
Fração hexano	$20,03 \pm 0,60$
Fração diclorometano	$12,66 \pm 0,46$
Fração acetato de etila	$4,37 \pm 0,18^{c,g,h}$
Fração aquosa	$5,91 \pm 0,64^{d,f,g}$
OCM	$6,12 \pm 1,25^{b,f}$
OEX	$4,28 \pm 0,10^{e,h}$
Eugenol	$1,51 \pm 0,037^a$

Os resultados foram expressos como a média \pm o desvio padrão da média.

Letras iguais indicam resultados estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$)

Os antioxidantes provenientes de fontes naturais podem fornecer novas possibilidades para o tratamento e prevenção de doenças mediadas pelo estresse oxidativo, bem como serem utilizados na indústria alimentícia em substituição aos antioxidantes sintéticos. Tal como descrito na revisão, *P. pseudocaryophyllus* vem sendo utilizada na medicina popular brasileira e é rica em compostos bioativos que apresentam atividade antioxidante (Fajemiroye *et al.*, 2012).

Sabe-se que compostos como os constituintes fenólicos, flavonoides e taninos possuem propriedades redutoras, sendo capazes de neutralizar radicais

livres, complexar com metais de transição (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio), interromper a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificando o potencial redox do meio e reparando moléculas atacadas por radicais livres (PODSEKEK, 2007; MIN; EBELER, 2008).

Neste estudo, verificou-se elevados teores de compostos fenólicos totais e taninos, além de flavonoides, no extrato hidroetanólico. Dessa maneira, sugere-se que a significativa atividade antioxidante encontrada no extrato hidroetanólico ($CI_{50} = 5,65 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$) seja devida a presença destes compostos. Este valor superou valores de atividade antioxidante encontrados para flavonoides isolados, como a quercetina ($CI_{50} = 10,25 \mu\text{g/mL}$) (OLIVEIRA *et al.*, 2014), ambos resultados obtidos pelo método de redução do DPPH. O resultado encontrado para o extrato hidroetanólico no presente estudo não apresentou diferença estatística com os resultados obtidos para OCM, OEX, fração aquosa e fração acetato de etila.

Campanini e colaboradores (2013) verificaram a atividade antioxidante do extrato etanólico de *P. pseudocaryophyllus* coletada em São Jerônimo da Serra-PR e encontraram resultados semelhantes ao encontrado neste estudo ($CI_{50} = 4,75 \mu\text{g/mL}$). Da mesma forma, atribuiu-se a considerável atividade antioxidante aos elevados teores de compostos fenólicos e flavonoides que foram encontrados.

Em relação aos valores de atividade antioxidante obtidos para as frações, nota-se que melhores resultados foram encontrados para as frações acetato de etila ($CI_{50} = 4,37 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$) e aquosa ($CI_{50} = 5,91 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$), as quais concentram maiores teores de flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos e compostos fenólicos em geral. As frações acetato de etila e aquosa não apresentaram diferença estatística entre si, nem com o extrato, o OC e o OE.

Já a fração diclorometano, a qual possui maiores teores de flavonoides metoxilados, lignanas, cumarinas, sesquiterpenos e triterpenos, a atividade antioxidante foi um pouco menor ($CI_{50} = 12,66 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$), mas ainda considerável. A fração diclorometano apresentou diferença estatística em relação a todas as outras amostras analisadas.

A fração hexano, conforme esperado, por extrair maiores teores de esteroides, terpenos e acetofenonas, apresentou menores valores de atividade antioxidante ($CI_{50} = 20,03 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$). A fração hexano apresentou diferença estatística em relação a todas as outras amostras analisadas. Dessa maneira, sugere-se que quanto maior a capacidade extrativa de compostos fenólicos, maior é

a capacidade antioxidante das frações.

Diante do exposto, sugere-se que o uso popular de *P. pseudocaryophyllus* no preparo de infusões aquosas pode ser uma alternativa para o tratamento e prevenção de doenças mediadas pelo stress oxidativo, já que a fração aquosa apresentou notável atividade antioxidante ($CI_{50} = 5,91 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$).

Além disso, o uso das folhas de *P. pseudocaryophyllus* pela população do Vale do Ribeira-PR, no preparo de alimentos como doces, geleias, feijão, carnes, ensopados, no intuito de se obter função flavorizante, ganha uma nova perspectiva de uso. Devido à atividade antioxidante apresentada pela espécie, pode-se obter uma ação conservante quando as folhas de *P. Pseudocaryophyllus* são utilizadas no preparo destes alimentos, através da inibição da oxidação lipídica. O estudo de produtos naturais com potencial aplicação em alimentos tem causado cada vez mais interesse devido à necessidade de produzir alimentos processados ao mínimo, com menos aditivos sintéticos, propriedades organolépticas preservadas e com extensa vida de prateleira.

O fenilpropanoide eugenol apresentou potente atividade antioxidante, estatisticamente semelhante ao padrão, com valor de $CI_{50} = 1,51 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$. A ação antioxidante do eugenol já foi descrita na literatura e é determinada pela estrutura metóxi-fenólica, a qual inibe a peroxidação lipídica pela varredura de radicais intermediários e de espécies reativas de oxigênio (FUJISAWA *et al.*, 2002).

A atividade do eugenol também pode ser dependente das características do ambiente em que se encontra (pH e solubilidade), podendo atuar como agente antioxidante em baixas doses e pró-oxidante em altas doses (ATSUMI *et al.*, 2001; FUJISAWA *et al.*, 2002). De acordo com Atsumi e colaboradores (2005), o tratamento de células de adenocarcinoma submandibular humano com o eugenol induziu a formação de baixas taxas de espécies reativas de oxigênio. O potencial antioxidante do eugenol também foi demonstrado por Yogalakshmi e colaboradores (2010), que observaram que o eugenol levou a uma diminuição da peroxidação de lipídeos, da oxidação de proteínas e de marcadores inflamatórios, quando células de fígado de ratos foram tratadas com a tioacetamida.

O OCM, que apresenta como constituinte majoritário o eugenol (66,93%), apresentou potente atividade antioxidante, com valor de $CI_{50} = 6,12 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$, sugerindo que a mesma seja devida ao alto teor de eugenol encontrado no óleo essencial. O resultado obtido para OCM não diferiu estatisticamente dos valores

encontrados para extrato, fração aquosa.

O OEX também apresentou como constituinte majoritário o eugenol (34,38%), e embora em menor proporção do que no OCM, o OEX apresentou melhor atividade antioxidante ($CI_{50} = 4,28 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), a qual foi estatisticamente semelhante aos valores obtidos para extrato e fração acetato de etila. Tal resultado de atividade antioxidante encontrado para o OEX pode ser atribuído em grande parte ao eugenol, entretanto, outros constituintes do OEX podem ter contribuído para tal atividade.

RUBERTO e BARATTA (2000) avaliaram a atividade antioxidante de alguns monoterpenos como terpinoleno, α -terpineno, γ -terpineno, os quais estão presentes no OEX. Em particular, a atividade do α -terpineno e do γ -terpineno foi comparável à do α -tocoferol e de compostos fenólicos. Dessa forma, terpinoleno, α -terpineno, γ -terpineno podem ter contribuído para a atividade antioxidante apresentada pelo OEX.

5.6 Macro e micromorfologia, determinação da CIM e da CFM

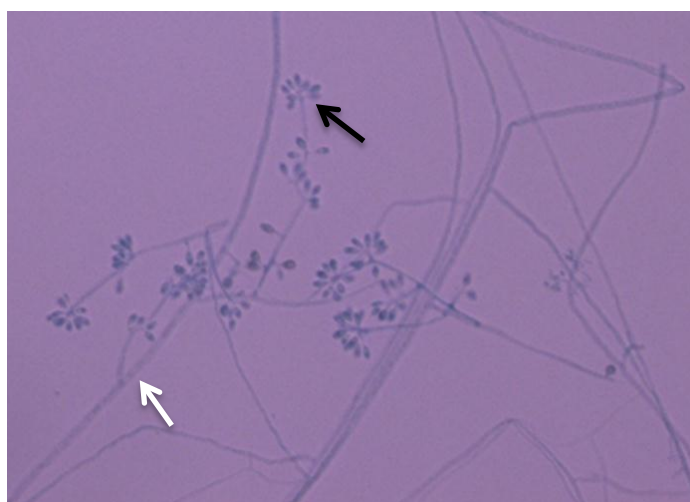
Após o cultivo em SDA por um período de 7 a 10 dias de incubação, em estufa a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, os fungos do complexo *S. schenckii* apresentaram colônias de coloração esbranquiçada, membranosas e enrugadas (Figura 51).

Figura 51. Imagem da colônia de *Sporothrix schenckii* cultivada em SDA



A morfologia microscópica foi analisada através da técnica de microcultivo. Após o período de 7 a 10 dias de incubação, em estufa a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, com o auxílio do microscópio óptico (Eclipse-E200, Nikon, Japão), foi possível observar as estruturas de reprodução (conídios, conidióforos) e de ornamentação (hifas), as mesmas ampliadas em 40 vezes (Figura 52).

Figura 52. Microcultivo de *Sporothrix schenckii*



A seta branca indica a presença de hifas septadas e ramificadas e a seta preta indica a presença dos conídios dispostos em forma de rosetas

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas (CFM) do OCM, OEX, eugenol e extrato hidroetanólico bruto de *P. Pseudocaryophyllus*, frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, encontram-se na Tabela 13. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ de amostra.

Tabela 13. Suscetibilidade *in vitro* das linhagens fúngicas frente ao OCM, OEX, eugenol e extrato hidroetanólico de *P. pseudocaryophyllus*

Linhagem Fúngica	OCM ($\mu\text{g/mL}$)		OEX ($\mu\text{g/mL}$)		Eugenol ($\mu\text{g/mL}$)		Extrato Etanólico ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii A</i>	131,05	262,10	520,90	1.041,86	68,73	274,90	>1.000	-
<i>S. schenckii B</i>	65,52	524,20	260,46	520,90	34,36	137,48	>1.000	-
<i>S. schenckii ATCC 1099-18</i>	262,10	1.048,4	260,46	520,90	137,48	549,94	>1.000	-
<i>S. schenckii IPEC 15383</i>	262,10	524,20	260,46	520,90	137,48	549,94	>1.000	-
<i>S. brasiliensis ATCC 5110</i>	262,10	524,20	260,46	520,90	137,48	549,94	>1.000	-
<i>S. brasiliensis IPEC 17943</i>	262,10	524,20	260,46	520,90	137,48	274,90	>1.000	-

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$.

A dificuldade de tratamento das infecções fúngicas representa um problema importante a ser sanado. Os antifúngicos disponíveis mostram-se tóxicos, de alto custo e podem permitir a recorrência da infecção (KANAFANI; PERFECT, 2008; LIPP, 2008). Neste cenário, as plantas medicinais surgem como fontes alternativas de novos medicamentos antifúngicos, buscando maior eficiência, acessibilidade e menor toxicidade.

Na avaliação do potencial antifúngico de plantas medicinais, destaca-se o método de microdiluição em caldo, o qual mostra-se muito útil, podendo estabelecer a concentração capaz de inibir o crescimento *in vitro* do micro-organismo, obtendo-se dados quantitativos com boa reprodutibilidade (SCORZONI *et al.*, 2007).

Dentre os produtos naturais provenientes de plantas com uso medicinal, destacam-se os óleos essenciais. Estes estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os óleos essenciais possuem diversas propriedades farmacológicas descritas na literatura e suas aplicações são variadas, dentre elas destaca-se o combate a infecções, por meio da atividade antibacteriana e antifúngica. (LIMA *et al.*, 2006; EL ASSAL, 2012; PAULA *et al.*, 2012). Além disso, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades

antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW; 1992; LIMA *et al.*, 2006). Cakir e colaboradores (2004), ressaltam ainda, que o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais depende do teor de compostos fenólicos dos mesmos.

Holetz e colaboradores (2002) sugerem um parâmetro para classificar a atividade antifúngica de produtos naturais com base no valor de CIM: menor ou igual a 100 $\mu\text{g/mL}$ é considerada boa, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ é considerada moderada e entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ é considerada fraca.

Com base no exposto, o OCM apresentou boa atividade antifúngica frente à linhagem clínica B (CIM=65,52 $\mu\text{g/mL}$) e atividade antifúngica moderada frente às demais linhagens empregadas no estudo com CIM de 131,05 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem clínica A e CIM de 262,10 $\mu\text{g/mL}$ para as demais linhagens. O OCM apresentou atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações que variam de 262,10 a 1.048,4 $\mu\text{g/mL}$.

O OEX apresentou uma atividade antifúngica moderada (CIM=260,46 $\mu\text{g/mL}$) frente à linhagem clínica B, *S. schenckii* IPEC 15383, *S. brasiliensis* ATCC 5110, *S. schenckii* ATCC 1099-18 e *S. brasiliensis* IPEC 17943; já em relação à linhagem clínica A, o OEX apresentou uma atividade fraca (CIM=520,90 $\mu\text{g/mL}$). O OEX apresentou atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações que variaram de 520,90 a 1.041,86 $\mu\text{g/mL}$.

Ribeiro (2013) também avaliou o potencial antifúngico do óleo de *P. pseudocaryophyllus* frente a fungos filamentosos. Foi observada atividade antifúngica frente a *Fusarium oxysporum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, com valores de CIM variando de 50 a 400 $\mu\text{g/mL}$.

O mecanismo de ação antimicrobiano dos óleos essenciais tem sido objeto de investigação de alguns autores. Tem sido relatado que a ação dos óleos essenciais contra fungos e bactérias Gram positivas parece ser semelhante. Os componentes dos óleos alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). A alteração dos gradientes de íons comprometem processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, processo de fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e extravazamento do citoplasma, e conseqüentemente, morte do microrganismo (COX *et al.*, 2000;

LAMBERT *et al.*, 2001; BURT, 2004).

No presente estudo também foi avaliada a atividade antifúngica do eugenol puro, o principal constituinte do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*. Dessa forma, buscou-se avaliar se há ocorrência de sinergismo entre os constituintes do óleo essencial, bem como avaliar se o eugenol, constituinte majoritário do óleo essencial em questão, é o responsável pela atividade antifúngica encontrada.

O eugenol apresentou uma boa atividade antifúngica frente às linhagens clínicas A (CIM=68,73 $\mu\text{g/mL}$) e B (CIM=34,36 $\mu\text{g/mL}$) e atividade antifúngica moderada frente às demais linhagens empregadas no estudo (CIM=137,48 $\mu\text{g/mL}$). O eugenol apresentou atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações que variam de 137,48 a 549,94 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato etanólico, na faixa de concentração avaliada, não apresentou atividade antifúngica, frente às linhagens testadas. Este resultado sugere que seja o eugenol o componente responsável em grande parte pela atividade antifúngica encontrada para os óleos essenciais, tendo em vista o OEX apresentar 34,38% de eugenol e o OCM 66,93%.

Para avaliar a influência do eugenol na atividade antifúngica, ajustou-se os resultados obtidos em termos de $\mu\text{g/mL}$ de óleo essencial para $\mu\text{g/mL}$ de eugenol, sendo este cálculo realizado a partir da porcentagem de eugenol encontrada por CG-EM (OCM: 66,93% de eugenol = 1.403,4 μg de eugenol; OEX: 34,38% de eugenol = 716,40 μg de eugenol), obtendo-se os resultados descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Suscetibilidade *in vitro* das linhagens fúngicas frente ao OCM, OEX e eugenol ajustados a 100% de eugenol

Linhagem Fúngica	OCM ($\mu\text{g/mL}$)		OEX ($\mu\text{g/mL}$)		Eugenol ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii A</i>	87,71	175,42	179,09	358,19	68,05	272,22
<i>S. schenckii B</i>	43,85	350,85	89,54	179,09	34,02	136,11
<i>S. schenckii ATCC 1099-18</i>	175,42	701,70	89,54	179,09	136,11	544,44
<i>S. schenckii IPEC 15383</i>	175,42	350,85	89,54	179,09	136,11	544,44
<i>S. brasiliensis ATCC 5110</i>	175,42	350,85	89,54	179,09	136,11	544,44
<i>S. brasiliensis IPEC 17943</i>	175,42	350,85	89,54	179,09	136,11	272,22

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos como $\mu\text{g/mL}$ do constituinte majoritário (eugenol).

Quando os resultados foram ajustados a 100% de eugenol, foi verificado uma melhor atividade antifúngica do OEX (CIM e CFM), para todas as linhagens padrão, em relação ao eugenol e ao OCM. Para as linhagens clínicas A e B foi verificada melhor atividade para o eugenol, seguido do OCM.

Estes resultados refletem que a atividade antifúngica apresentada pelo OEX, é em grande parte devida ao eugenol, entretanto, a melhor atividade encontrada para o OEX em relação ao eugenol, reflete a existência de sinergismo entre os constituintes do OEX, uma vez que foram identificadas por CG-EM, 22 substâncias, dentre elas, monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos, os quais podem ter interagido de forma sinérgica com o eugenol, contribuindo para a maior atividade antifúngica apresentada pelo óleo essencial.

O eugenol é uma substância fenólica presente em óleos essenciais de algumas plantas. Dentre estas destacam-se: *Eugenia caryophyllus*, o “cravo-da-índia”; *Dicopelium cariophyllatum*, “o craveiro do Maranhão ou cravinho” e o *Croton zenhtneri*, a “canela-de-cunha” (CRAVEIRO *et al.*, 1981; WU *et al.*, 1994).

O eugenol possui diversas ações farmacológicas descritas na literatura, como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, modulador de respostas imunes, antinociceptiva e anestésica local (MARKOWITZ *et al.*, 1992; WRIGHT *et*

al., 1995; BOURNE *et al.*, 1999; RAKOTONIRAINY; LAVÉDRINE, 2005).

A atividade antimicrobiana do eugenol tem sido atribuída à sua estrutura fenólica que em concentrações mais elevadas provoca a degeneração das proteínas das membranas celulares dos micro-organismos resultando em um dano na membrana celular (MARKOWITZ *et al.*, 1992; ESCOBAR, 2002).

Resultados como os supracitados, que demonstram o potencial antimicrobiano da espécie *P. Pseudocaryophyllus*, têm sido descritos na literatura (LIMA *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2009; EL ASSAL, 2012; FERNANDES, 2012; PAULA *et al.*, 2012).

Paula e colaboradores (2012) pesquisaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de dois quimiotipos de *P. pseudocaryophyllus*, ricos em citral e em metiliso Eugenol. O óleo essencial do quimiotipo citral mostrou boa atividade (CIM = 62,5 µg/mL) contra *B. cereus* ATCC 14579 e moderada atividade (MIC = 125 µg/mL) contra o restante das bactérias Gram-positivas; em alguns casos, este óleo essencial mostrou melhor inibição do que o citral puro (MIC = 125-250 µg/mL). O óleo essencial do quimiotipo metileugenol foi inativo contra as bactérias nas condições avaliadas.

Estudo realizado por Susuki e colaboradores (2014), avaliou a eficácia do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* na inibição do crescimento das principais bactérias responsáveis pelo mau odor da transpiração (*Staphylococcus epidermidis*, *Proteus hauseri*, *Micrococcus* e *Corynebacterium xerosis yunnanensis*). Neste estudo, o óleo essencial de *P. Pseudocaryophyllus*, que apresentou como constituinte majoritário o eugenol (88,6%), exibiu atividade bacteriostática contra todas as bactérias testadas, exceto para *S. Epidermidis*, com valores de CIM variando de 500 µg/mL a 1000 µg/mL.

Em relação aos fármacos de referência para o tratamento da esporotricose, os resultados obtidos de CIM e CFM expressos em µg/mL estão ilustrados na Tabela 15.

Tabela 15. Suscetibilidade *in vitro* das linhagens fúngicas frente ao fármacos de referência itraconazol, anfotericina B e cetoconazol

Linhagem Fúngica	Itraconazol ($\mu\text{g/mL}$)		Anfotericina ($\mu\text{g/mL}$)		Cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii A</i>	>128	-	1,0	1,0	2,0	4,0
<i>S. schenckii B</i>	>128	-	2,0	2,0	2,0	4,0
<i>S. schenckii ATCC 1099-18</i>	>128	-	2,0	2,0	4,0	8,0
<i>S. schenckii IPEC 15383</i>	>128	-	1,0	1,0	4,0	8,0
<i>S. brasiliensis ATCC 5110</i>	>128	-	2,0	2,0	4,0	8,0
<i>S. brasiliensis IPEC 17943</i>	>128	-	2,0	2,0	2,0	4,0

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos como $\mu\text{g/mL}$

Para os fármacos de referência, a avaliação da suscetibilidade fúngica pode ser realizada com base nos valores de CIM. Aqueles menores ou iguais a 1 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B e azóis indicam sensibilidade ao agente antifúngico; valores maiores do que 2 $\mu\text{g/mL}$ tem sido associado ao fracasso dos tratamentos; enquanto valores maiores ou iguais a 4 $\mu\text{g/mL}$ indicam resistência das linhagens fúngicas (CLSI, 2008; SANTOS, 2012).

A partir dos resultados expostos na Tabela 15, pode-se observar que somente duas das linhagens estudadas (*S. schenckii A* e *S. schenckii IPEC 15383*) apresentaram sensibilidade à anfotericina B e nenhuma foi susceptível ao cetoconazol. Além disso, três linhagens foram consideradas resistentes ao cetononazol com valores de CIM de 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Foram elas: *S. schenckii ATCC 1099-18*, *S. schenckii IPEC 15383* e *S. brasiliensis ATCC 5110*.

Ao avaliar o perfil de susceptibilidade *in vitro* de três linhagens padrão do fungo *S. brasiliensis* frente a anforetica B, Santos (2012) verificou que duas das três linhagens apresentaram resistência ao fármaco, com valores de CIM de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ a 16,0 $\mu\text{g/mL}$. Somente uma linhagem foi considerada sensível (CIM=1,0 $\mu\text{g/mL}$) (SANTOS, 2012).

Em relação ao itraconazol, todas as linhagens foram extremamente

resistentes, com valor de CIM > 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tais achados confirmam o que vem sendo descrito na literatura com relação aos derivados azólicos, os quais devido ao uso excessivo na terapia de micoses, vem apresentando casos de resistência em espécies anteriormente suscetíveis e com isso, falha terapêutica e recidiva da doença (LOPES-BEZERRA, 2006).

Giordani e colaboradores (2014) avaliaram a susceptibilidade de sete isolados de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de casos clínicos de felinos (n=6) e canino (n=1) frente ao itraconazol. Para os isolados de felinos, foram encontrados valores de CIM=64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para dois isolados e CIM>64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para um isolado. Para o isolado de canino foi encontrado valor CIM=16 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Em estudo desenvolvido por Silveira e colaboradores (2009) realizado com 62 linhagens de *S. schenckii* isolados no Peru, Brasil, Uruguai, Venezuela e Espanha, foi observado que 64 % dos isolados foi susceptível ao itraconazol a uma CIM de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No mesmo estudo, foi encontrada CIM de 10,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para isolados provenientes do Uruguai, apresentando resistência fúngica.

Em estudo desenvolvido por Rodrigues e colaboradores (2014), com 68 linhagens de fungos do complexo *S. schenckii*, isoladas de lesões clínicas de pacientes (n = 65 homem / n = 2 animais) e a partir de fontes ambientais (n = 1); foram encontrados valores de atividade antifúngica moderados para o itraconazol, com CIM variando de 0,25 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra isolados de *S. brasiliensis* (n=22), CIM variando de 0,25 a >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra isolados de *S. schenckii* (n=39), CIM variando de 0,5 a >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra isolados de *S. globosa* (n = 4) e CIM variando de 2 a >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *S. mexicana* (n= 3).

Apesar dos valores relativamente altos encontrados em todos os estudos citados, autores têm demonstrado a eficácia do itraconazol em estudos clínicos. Barros e colaboradores (2011) avaliaram o tratamento clínico de um grande número de pacientes com esporotricose no Rio de Janeiro, com itraconazol (50-400 mg/dia), obtendo a cura em 94,6% dos pacientes (n = 610).

Os resultados expostos sugerem indícios de resistência fúngica das linhagens estudadas em relação aos fármacos de referência empregados no tratamento da esporotricose, principalmente em relação ao itraconazol, e ainda, reforçam a necessidade de busca de novos medicamentos antifúngicos para o tratamento desta micose subcutânea.

5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram obtidas eletromicrografias das linhagens fúngicas *S. schenckii* ATCC 1099-18 e *S. brasiliensis* IPEC 17943 não expostas a qualquer tipo de tratamento (grupo não tratado) e expostas aos óleos essenciais (OCM e OEX), ao eugenol e aos fármacos de referência (itraconazol e anfotericina B).

Nota-se que houve alterações estruturais e morfológicas nos grupos tratados quando comparados ao grupo não tratado. Nos grupos não tratados puderam ser observadas hifas com superfície regular, alongadas e conídeos alongados com superfície regular. As estruturas fúngicas submetidas a ação dos agentes antifúngicos apresentaram deformidades em sua estrutura (fissuras e quebras de hifas, hifas e conídeos contorcidos, hifas finas e extravasamento celular), com provável destruição celular.

Quando o *S. brasiliensis* foi tratado com o OEX (Figura 53 B), foram observadas hifas quebradas e afinadas, partes contorcidas e extravasamento celular, porém, no tratamento da linhagem *S. schenckii* com OEX (Figura 54 B), as alterações foram mais pronunciadas, podendo ser observadas hifas quebradas, com presença de rugosidades, muitas partes contorcidas e aglomerados de hifas.

No tratamento com o OCM frente ao fungo *S. brasiliensis* (Figura 53 C) constatou-se alterações morfológicas muito pronunciadas com presença de hifas quebradas, presença de rugosidades e hifas contorcidas. Já em relação ao tratamento do *S. schenckii* com OCM as alterações morfológicas foram mais brandas, podendo ser observadas hifas finas e com pequenas contorções (Figura 54 C).

Quando o *S. brasiliensis* foi tratado com o eugenol (Figura 53 D), foram observadas hifas e conídios com rugosidades na membrana. De maneira semelhante quando o *S. schenckii* foi exposto ao eugenol (Figura 54 D), pode-se observar hifas quebradas, com presença de rugosidades e partes contorcidas.

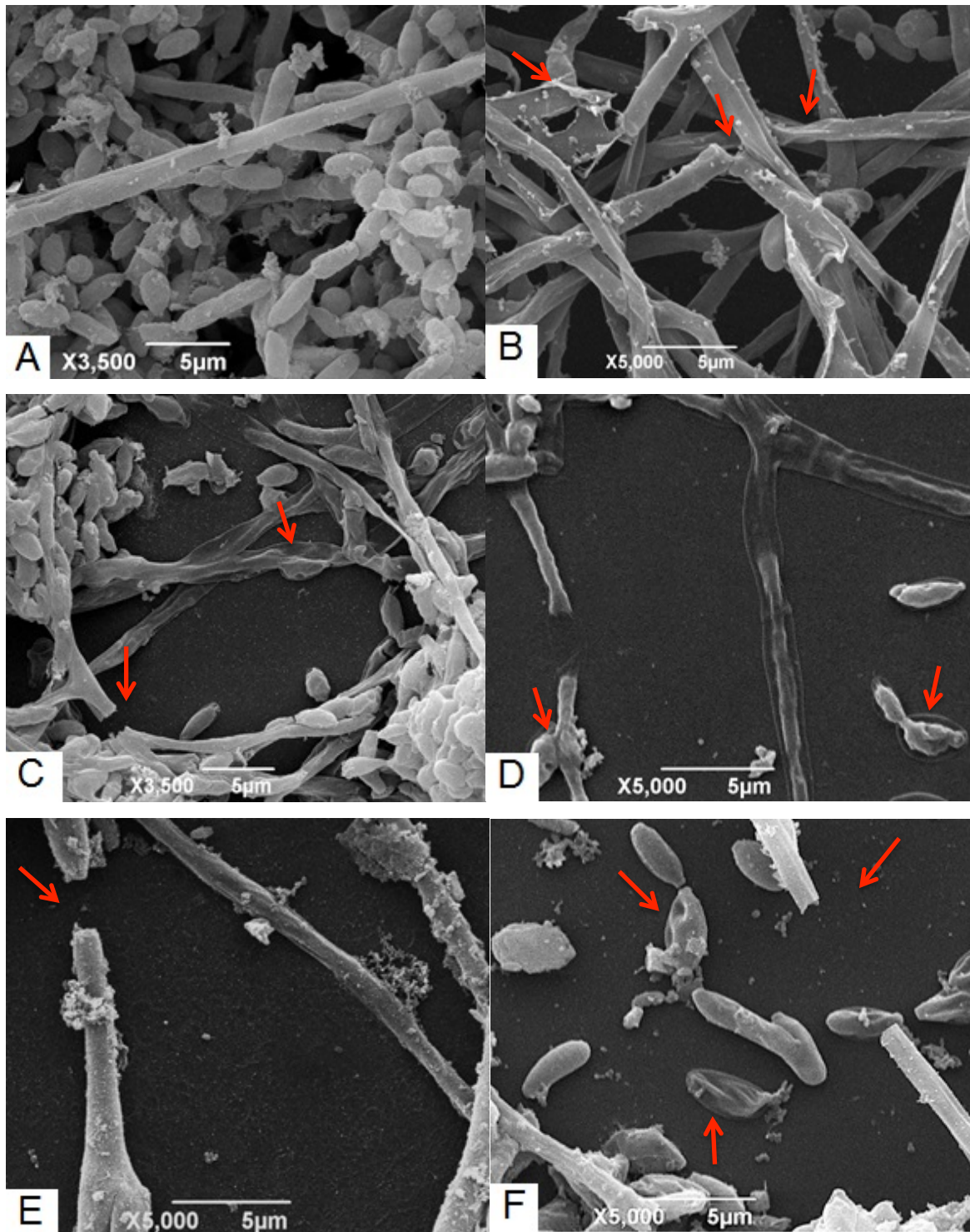
Após serem submetidas ao tratamento com o fármaco de referência itraconazol, a linhagem *S. brasiliensis* (Figura 53 E) apresentou quebra de hifas. De forma mais branda, no tratamento do *S. schenckii* com o itraconazol, foram observadas hifas finas e com presença de rugosidades (Figura 54 E).

Ao analisar as Figura 53F e 54F, quando as linhagens de *S. brasiliensis* e

S. schenckii foram expostas à anfotericina B, pode-se observar quebra de hifa e presença de rugosidades nas hifas e nos conídeos.

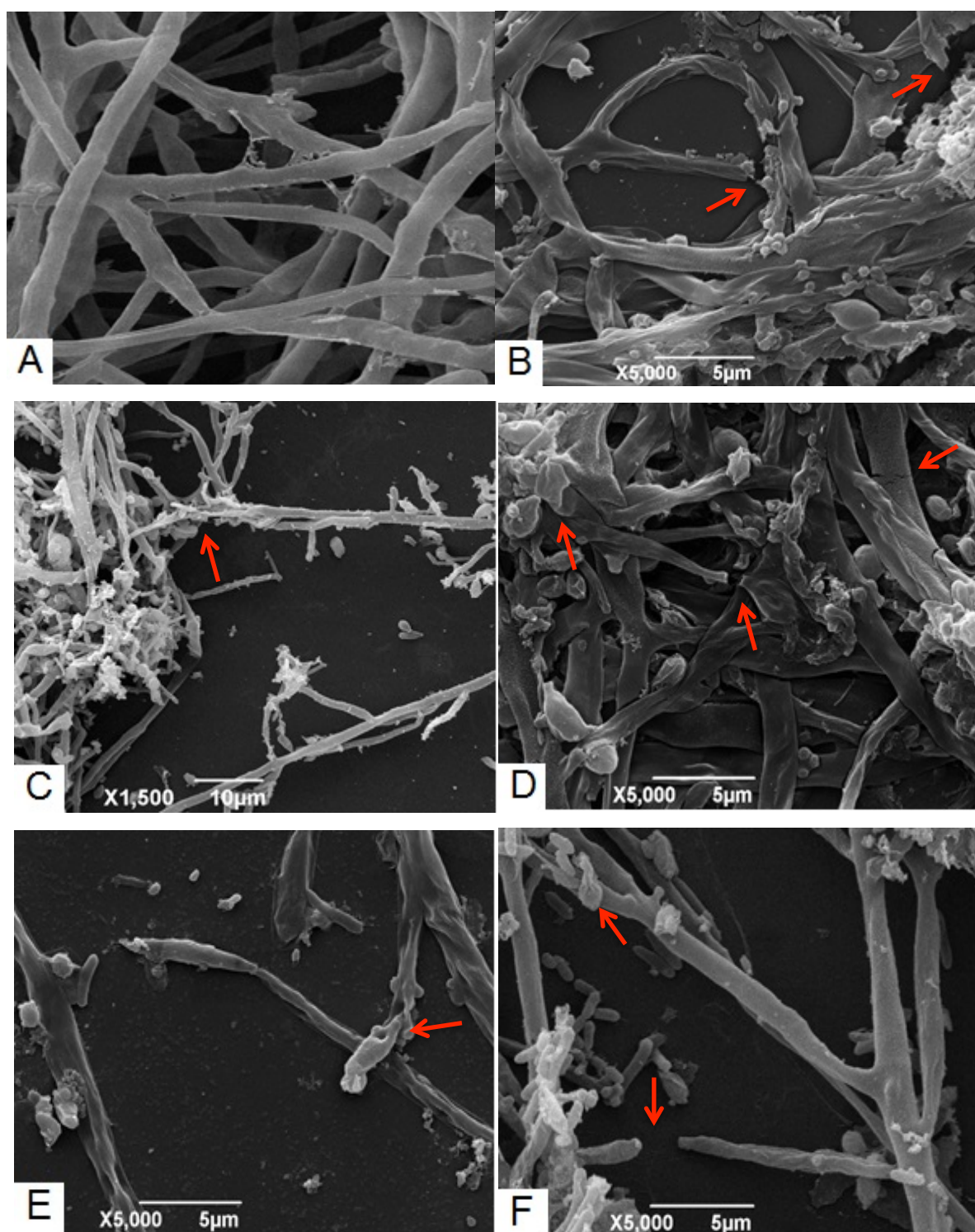
Todas as imagens revelaram que, tanto nos fungos expostos aos tratamentos experimentais, quanto naqueles expostos aos fármacos de referência, houve, semelhantes alterações morfológicas nas estruturas fúngicas e uma redução no número de estruturas de reprodução aderidas (conídeos). Tais alterações podem estar relacionadas a mudanças na permeabilidade da membrana plasmática. Cox e colaboradores (2000) sugerem que os óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica da membrana celular do micro-organismo, causando um aumento da permeabilidade e perdas de constituintes intracelulares vitais. De forma semelhante, a atividade antimicrobiana do eugenol tem sido atribuída à sua estrutura fenólica que em concentrações mais elevadas provoca a degeneração das proteínas das membranas celulares dos micro-organismos resultando em um dano na membrana celular (MARKOWITZ *et al.*, 1992; ESCOBAR, 2002).

Figura 53. Eletromicrografias de *S. brasiliensis* IPEC 17943 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e aos fármacos de referência



A) Não tratado. B) Tratado com OEX. C) Tratado com OCM. D) Tratado com eugenol. E) Tratado com itraconazol F) Tratado com anfotericina b.

Figura 54. Eletromicrografias de *S. schenckii* ATCC 1099-18 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e aos fármacos de referência

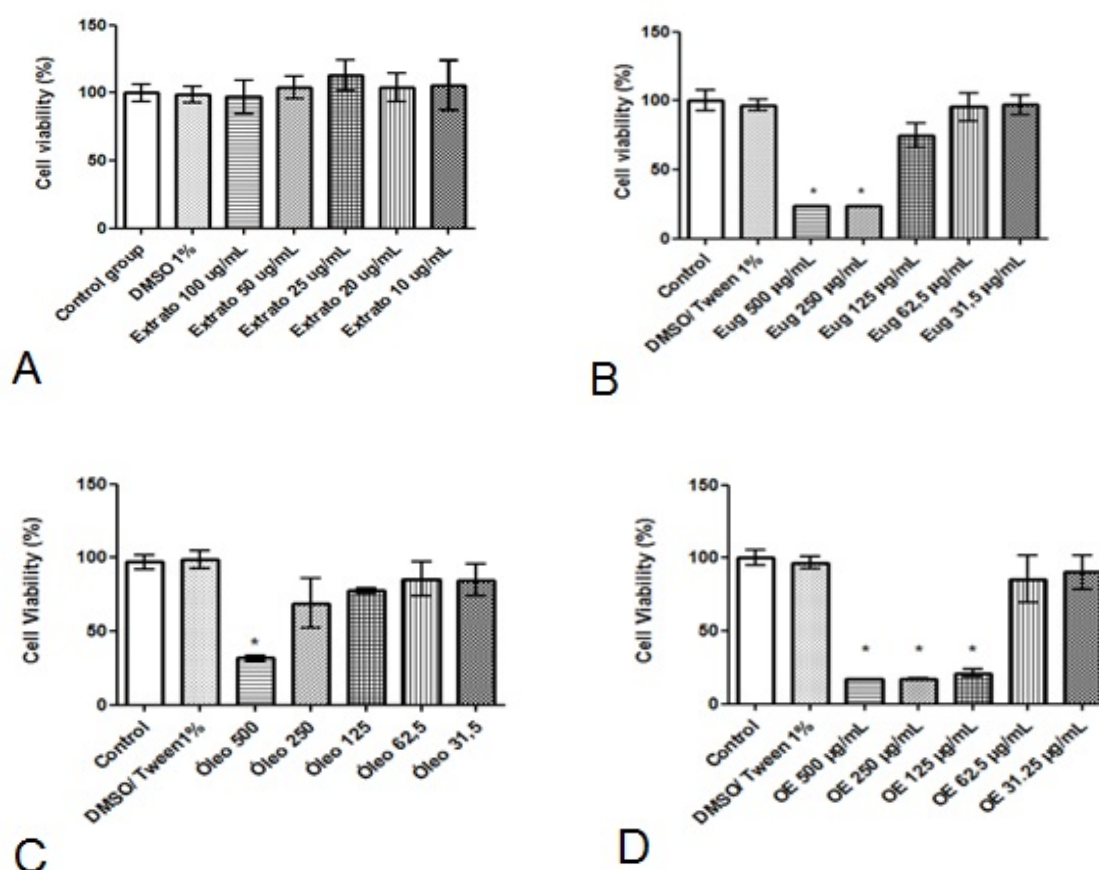


A) Não tratado. B) Tratado com OEX. C) Tratado com OCM. D) Tratado com eugenol. E) Tratado com itraconazol F) Tratado com anfotericina b.

5.8 Citotoxicidade

Os resultados de viabilidade celular foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. A porcentagem de viabilidade celular das amostras foram comparadas com o grupo não tratado, o qual foi definido como 100% de viabilidade celular. Os dados de cada ensaio foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Nenhum tratamento com os diluentes DMSO 1% e DMSO/Tween 1% teve diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Os resultados estão representados na Figura 55.

Figura 55. Viabilidade celular (L929) após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações das amostras



Valores expressos como a média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$. A) Extrato. B) Eugenol. C) OCM. D) OEX.

Uma das técnicas mais rápidas e precisas para avaliação da citotoxicidade de um composto é o método colorimétrico de redução do MTT, que quantifica o metabolismo mitocondrial e a atividade respiratória das células, através da redução dos sais de tetrazólio a formazan por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas.

Relatos da toxicidade de substâncias oriundas de produtos vegetais são encontrados na literatura; um exemplo são os efeitos tóxicos ocasionados pelo uso de cápsulas de têucro (*Teucrium chamaedrys* L.), que causou uma epidemia de hepatite na França, devido a diterpenos do tipo neoclerodano, que são transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos (LOEPER *et al.*, 1994; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Outro relato importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L.) que é utilizado na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998).

Diante desses e outros relatos encontrados na literatura, estudos que visem à determinação dos aspectos toxicológicos de produtos de origem vegetal são de fundamental importância, para que, além da comprovação da sua eficácia, possam ser também, comprovadamente seguros.

Não há na literatura, relatos de estudos de citotoxicidade para a espécie *Pimenta pseudocaryophyllus*. No presente estudo, verificou-se que o tratamento realizado com seu extrato nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, ou seja, não apresentou citotoxicidade frente aos fibroblastos nas concentrações avaliadas. A faixa de concentração em que o extrato apresentou atividade antioxidante ($\text{IC}_{50} = 5,65 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$) é inferior a que foi avaliada no estudo de citotoxicidade, desta forma, o extrato não mostrou-se tóxico nas concentrações em que foi ativo.

O tratamento com eugenol mostrou-se citotóxico em concentrações maiores ou igual a 250 $\mu\text{g/mL}$. Em relação a atividade antioxidante obtida para o eugenol, a mesma corresponde a uma faixa bem inferior a qual ele foi tóxico ($\text{IC}_{50} = 1,51 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$). O mesmo pode ser observado para a atividade antifúngica, na qual a CIM variou de 34,36 a 137,48 $\mu\text{g/mL}$.

Wright e colaboradores (1995) estudaram a toxicidade do eugenol *in vivo*. No estudo, foi avaliado o efeito da injeção intravenosa de eugenol em ratos como

causa de edema pulmonar não-cardiogênico, de fisiopatologia pulmonar desconhecida. A injeção em doses de 4 e 8 μL (6,52 mol/l) causaram dificuldade respiratória aguda por edema pulmonar hemorrágico. Os espécimes histológicos exibiram edema perivascular, intersticial e alveolar, extravasamento de hemácias e neutrófilos no espaço alveolar, captura de neutrófilos pelos capilares alveolares. O quadro histológico demonstrou que a infusão intravenosa de eugenol provoca edema pulmonar hemorrágico, com sequestro intrapulmonar de neutrófilos.

Em relação ao OCM, concentrações maiores ou igual a 500 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas citotóxicas. Dessa maneira, a faixa em que o OCM apresentou atividade antifúngica (CIM= 65,52 a 262,10 $\mu\text{g/mL}$) e antioxidante (IC_{50} =6,12 \pm 1,25 $\mu\text{g/mL}$) é inferior a qual ele mostrou-se tóxico aos fibroblastos.

O OEX mostrou-se citotóxico em concentrações maiores ou igual a 125 $\mu\text{g/mL}$. Em relação a atividade antioxidante obtida para o OEX, a mesma corresponde a uma faixa bem inferior a qual ele foi citotóxico (IC_{50} =4,28 \pm 0,10 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, em relação a atividade antifúngica, a faixa na qual apresentou atividade (CIM= 260,46 a 520,90 $\mu\text{g/mL}$), o OEX também mostrou-se tóxico. Assim, o OEX, apesar de apresentar o menor teor de eugenol (34,38%) entre as amostras analisadas, apresentou a maior citotoxicidade, sugerindo que a citotoxicidade do OEX, deve-se a sua matriz complexa e não ao eugenol exclusivamente.

6. CONCLUSÃO

O *screening* fitoquímico realizado com o extrato hidroetanólico 95% v/v das folhas de *P. pseudocaryophyllus* resultou na identificação de flavonoides, taninos e proantocianidinas. A quantificação destes metabólitos secundários na droga vegetal, por espectrofotometria UV-VIS, corroborou com o que vem sendo descrito para a espécie quanto aos teores de constituintes fenólicos totais (18,77%), taninos (10,69%) e flavonoides (0,52%). Estes resultados, aliados aos descritos por outros autores, é um importante passo para o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade para a espécie *P. pseudocaryophyllus*.

O perfil cromatográfico obtido por CG-EM do OEX indicou elevados teores de monoterpenos (48,83%) e fenilpropanoides (39,08%), apresentando como constituinte majoritário o eugenol (34,38%). Já o OCM apresentou elevados teores de sesquiterpenos (25,64%) e fenilpropanoides (70,05%), apresentando como constituinte majoritário o eugenol (66,93%). A literatura relata diferente constituição química para o óleo essencial desta espécie, sugerindo a existência de diferentes quimiotipos, no presente estudo, constatou-se que as espécimes estudadas pertencem ao quimiotipo do eugenol.

Extrato e frações de *P. pseudocaryophyllus* apresentaram notável atividade antioxidante pelo método de redução do DPPH. Sugere-se que a mesma seja atribuída aos altos teores de compostos fenólicos, flavonoides e taninos encontrados no extrato etanólico, uma vez que, verificou-se no estudo que, quanto maior a capacidade extrativa de compostos fenólicos, maior foi a capacidade antioxidante das frações.

O eugenol apresentou resultado de atividade antioxidante estatisticamente semelhante ao padrão de ácido ascórbico. Promissores resultados de atividade antioxidante foram encontrados para os OEX e OCM, os quais possuem como constituinte majoritário o eugenol. Sugere-se que a mesma seja atribuída em grande parte ao eugenol, mas é provável que outros compostos, tais como os monoterpenos terpinoleno, α -terpineno, γ -terpineno, influenciem na ação antioxidante.

O OEX apresentou atividade antifúngica frente a todas as linhagens testadas em concentrações que variaram de 260,46 $\mu\text{g/mL}$ a 520,90 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima

de 520,90. O OCM foi capaz de inibir todas as linhagens testadas em concentrações que variaram de 65, 52 $\mu\text{g/mL}$ a 260,10 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 262,10 $\mu\text{g/mL}$. O eugenol apresentou atividade antifúngica frente a todas as linhagens testadas em concentrações que variaram de 34,36 $\mu\text{g/mL}$ a 137, 48 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 137,48.

Ao ajustar os resultados de atividade antifúngica a 100% do constituinte majoritário eugenol, verificou-se a existência de sinergismo entre os constituintes do OEX, que apresentou maior atividade antifúngica (CIM=89,54 $\mu\text{g/mL}$) do que o eugenol (CIM=136,11 $\mu\text{g/mL}$) para quatro das seis linhagens estudadas.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que *P. pseudocaryophyllus* possui potencial como opção terapêutica para a esporotricose, podendo ser uma alternativa para aumentar o arsenal de medicamentos utilizados na doença e orientar/validar o uso na medicina popular.

Foi observado que somente duas das linhagens estudadas (*S. schenckii* A e *S. schenckii* IPEC 15383) apresentaram susceptibilidade à anfotericina B e nenhuma foi susceptível ao cetoconazol. Além disso, três linhagens foram consideradas resistentes ao cetononazol com valores de CIM de 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao itraconazol, todas as linhagens estudadas foram consideradas resistentes, com valores de CIM>128 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados sugerem indícios de resistência fúngica das linhagens estudadas em relação aos fármacos de referência empregados no tratamento da esporotricose e ainda, reforçam a necessidade de busca de novos medicamentos antifúngicos para o tratamento desta micose subcutânea.

As eletromicrografias das das linhagens fúngias *S. schenckii* ATCC 1099-18 e *S. brasiliensis* IPEC 17943 revelaram que, tanto nos fungos expostos aos tratamentos experimentais, quanto naqueles expostos aos fármacos de referência, pode-se observar deformidades na estrutura fúngica (fissuras e quebras de hifas, hifas e conídeos contorcidos, hifas finas e extravasamento celular), quando comparadas ao grupo não tratado.

Em relação aos ensaios de citotoxicidade realizados com fibroblasto murino (L929) pelo método de redução do MTT, o extrato não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas (10 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$), o eugenol não apresentou citotoxicidade em concentrações menores ou igual a 125 $\mu\text{g/mL}$, o OCM

não foi citotóxico em concentrações menores ou igual a 250 $\mu\text{g/mL}$. Já em relação ao OEX concentrações inferiores ou igual a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABAUL, J.; BORGEOIS, P.; BESSIERI, J.M.; Chemical composition of the essential oils of chemotypes of *Pimenta racemosa*. **Flavor and fragrance journal**, v.10, n. 5, p. 319-321, 1995.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4^a ed. Carol Stream, IL, **USA: Allured Publishing Corporation**, 2007.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 17 p. 114-140, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 16 p. 678-689, 2006.
- ALMEIDA, L. M. M.; SOUZA, E. A. F.; BIANCHIN, D. B. SVIDZINSKI, T. I. E. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 249-255, 2009.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ- GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA M.C.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v.11, p.554-562, 2009.
- ALVARADO-RAMÍREZ. E.; TORRES-RODRÍGUEZ. J.M. In Vitro Susceptibility of *Sporothrix schenckii* to Six Antifungal Agents Determined Using Three Different Methods. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.51, n.7, p.2420-2423, 2007.
- ALVES, S.H.; BOETTCHER, C.S.; OLIVEIRA, D.C. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 43, p. 523–525, 2010.
- ARECHAVALA, A.T.O.; MAIOLO, E.; MUJICA, M.T.; FERNANDEZ, M.; NEGRONI, R. Esporotricosis Diseminada, Con Compromiso Cutáneo y Visceral. **Revista de Patologia Tropical**. V.40, n.1, p. 73-84, 2011.
- ARNOLD, W.N.; MANN, L.C.; SAKAI, K.H.; GARRISON, R.G.; COLEMAN, P.D. Acid phosphatases of *Sporothrix schenckii*. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.3421-3432, 1986.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology Infection**. V.15, p. 651–5, 2009.

ASSIS, M.A.; MORELLI, A.V.; PIMENTA, F. Research groups and their scientific literature on medicinal plants: an exploratory study in the state of Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 9(1): 1-72, Jan-Mar 2015.

APPENZELLER, S.; AMARAL, T.N.; AMSTALDEN, E.M.I.; BERTOLO, M.B.; NETO, J.F.M.; SAMARA, A.M.; FERNANDES, S. R. *Sporothrix schenckii* infection presented as monoarthritis: report of two cases and review of the literature. **Clinical Rheumatology**, v.25, n.6, p.926-928, 2006.

ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA, S.; UEHA, T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials**, v. 22, p.1459-1466, 2001.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology In Vitro**, v. 19, p. 1025-1033, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian Medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BARONI, F.A.; CAMPOS, S.G.; DIREITO, G.M. A cat sporotrichosis case. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. V. 20(1) p : 25, 1998.

BARRETT, D.; From natural products to clinically useful antifungals. **Biochimie Biophys Acta**, v. 1587, p. 224-233, 2002.

BARROS M.B.L.; SCHUBACH A.O.; GALHARDO M.C.; SCHUBACH T.M.P.; REIS R.S., CONCEIÇÃO M.J.; VALLE A.C. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions – a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v.42, p. 677– 68, 2003.

BARROS, M.B.L.; SCHBACH, A.O.; VASCONCELLOS, C.O.; MARTINS, E.B.; TEIXEIRA, J.L.; WANKE, B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with Itraconazole-Study of 645 patients. **Clinical Infect Diseases**, v. 52, p. 200–206, 2011.

BARROS, M. B. L.; GREMIAO, I. D.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolucao e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.27, n.6, p. 455, 2010.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.P.; GALHARDO, M.C. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v 96, p. 777-9, 2001.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. **Fundamentos**

de **Toxicologia**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

BEAL, B.H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* ROSCOE)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BHAVANANI, S.M.; BALLOW, C.H. 1992. New agents for Gram-positive bacteria. **Curr Opin Microbiol** v. 13, p. 528-534, 1992.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, V. 32, N. 3, p. 588-594, 2009.

BOURNE, K. Z.; BOURNE, N.; REISING, S.F.; STANBERRY, L.R.; Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, v. 42, p. 219-236, 1999.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognodia**. V. 17, p. 640-653, 2007.

BRANDÃO, M. **Árvores nativas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG. 528 p, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no sistema Único de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 de maio de 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. 2004. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_cometo.pdf>. Acesso em: 26/08/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: MS; 2012. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica, n. 31).

BRAVO, T. C. New observations on the epidemiology of sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* complex. **Revista Latinoamericana de Patologia Clínica**, v, 59, n. 2, p. 88-100, 2012.

BRITO, M.M.S.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; RAIBOLT, P.S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.P.; SCHÄFFER, G.M.V.; BORBA, C.M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Medical Mycology**, v.45, p.721-729, 2007.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine. **Natur wissenschaften**, v. 85, p. 155-163, 1998.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS P. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Reviews Anti-infectious Therapy**, v.2, p.85-94, 2004.

CANESCHI, C. A. **Potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.)**. 2013. 85f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. **Mycopathologia**, v.117, p.139- 144, 1992.

CASTRO, A.H.F.; ALVARENGA, A.A.; SOARES, A.M.; YOUNG, M.C.M.; PURCINO, A.A.C. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.45-55, 2005.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 39, p. 179-184, 2010.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CHIRINOS, R; PEDRESCHI, R.; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y; CAMPOS, D. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. **Industrial Crops and Products**, v.47, p.145–152, 2013.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; RODRIGUES, M. R. A.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Atividade in vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.513-516, 2008.

Clinical and Laboratory and Standards Institute (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-2A**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2008.

CORDEIRO et al., Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v 86(4Supl1), p.121-4, 2011.

CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; PALAZZO, S. Morphogenesis of *Sporothrix schenckii* “in vivo” and “in vitro” through the method of viability by fluorescence. **Applied Fluorescence Technology**, v.3, p.1-8, 1991.

CORREIA, R. T. P.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, v.18, n.6, p.539–547, 2012.

CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; NAKAMURA, C. V. Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (LABIATAE). **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.2(2), p. 125, 1998.

COSKUN, B.; SARAL, Y.; AKPOLAT, N.; ATASEVEN, A.; ÇIÇEK, D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. **Mycopathologia**, v.158, p. 53-56, 2004.

COSTA, R.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; AZULAY-ABULAFIA, L.; BENVENUTO, F.; NEVES, M.L.P.; LOPES-BEZERRA, L.M. Esporotricose na gestação: relato de cinco casos numa epidemia zoonótica no Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86(5), p.995-998, 2011.

CRAVEIRO, A. C.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste, **Edições UFC**, 1981.

CRIADO P. R.; DE OLIVEIRA C. B.; DANTAS K. C.; TAKIGUTI, F. A.; BENINI, L. V.; VASCONCELLOS, C. Micose superficial e os elementos da resposta imune. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, p. 726-731, 2011.

CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**. V. 20 (Edição Comemorativa), p. 08-28, 2013.

CUSTÓDIO, D. L.; BURGO, R. P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A. M.; REZENDE, M. I.; DANIEL, J. F. S.; PINTO, J. P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T. J. Antimicrobial activity of essential oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 1363-1369, 2010.

CUSTÓDIO, D.L.; KOLB, R.M.; FARIA, T.J.; BIANCHINI, E. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae): stem and leaf anatomy of a medicinal plant. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 111-124, jul./dez. 2013.

DAI, J.; GUPTA, A.; GATES, L.; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.837-847, 2009.

DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D. A. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463- 471, 1963.

DUDAREVA N., PICHERSKY E, GERSHENZON J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

DUNSTAN, R.W.; LANGHAM, R.F.; REIMANN, K. A .; WAKENELL. Feline sporotrichosis: A report of five cases with transmission to humans. **Journal of the**

American Academy of Dermatology, v.15, n.1, 1986.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

EFFERTH, T.; KAINA, B. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. **Crit Revist Toxicology**. V. 40(5), p. 405-21, 2010.

EL ASSAL, F. E. **Bioatividade *in vitro* de *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre *Candida* spp. e complexo *Cryptococcus neoformans***. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas, Ventajas y desventajas de su uso. **Review Cubana Estomatology**, v. 39, 2002.

FARIAS, M.R.; COSTA, P.R.S.; FRANCO, S.R.V.S.; FERREIRA, H. Esporotricose canina e felina. **Cães & Gatos**, v.66, p.30-38, 1997.

FARIAS, V.; ROCHA, L. D.; PREUSSLER, K. H.; MARANHO, L. T. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, p. 398-406, 2009.

FERNANDES, G.F.; SANTOS, P.O.; AMARAL, C.C.; SASAKI, A.A.; GODOY-MARTINEZ, P.; et al. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* Isolates from 5 Different Chromosomal Polymorphism and *S. schenckii* Complex Geographic Regions of Brazil: A Forgotten and Re-Emergent Pathogen. **Journal Open Mycology**. V. 3, p. 48–58, 2009.

FERNANDES, G.F.; SANTOS, P.O.; RODRIGUES, A.M.; SASAKI, A.A.; BURGER, E. et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**. V. 4, 2013.

FERNÁNDEZ, S.F.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; GUARRO, J. Virulence of *Sporothrix luriei* in a Murine Model of Disseminated Infection. **Mycopathologia**. v. 173, p. 245-249, 2012.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBAR, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**. v.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997.

FIGUEIREDO, F.F.; CUZZI-MAYA, T.; PEREIRA, S.A.; SANTOS, I.B.; PAES,R.A.; PAES-LEME, L.R.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Micology**, v.44, p.87-92, 2006.

FIGUEIREDO, C.A.; GURGEL, I.G.D.; JUNIOR, G.D.G. The National Policy on Medicinal Plants and Phytotherapy: building, perspectives and challenges. *Physis: Revista brasileira de Saúde Coletiva*. v. 24 n.2, 2014.

FILIPPIN, F.; SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, p. 167-194, 2006.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.5, 499-500, 2005.

FOWLER, M.W. Plants medicines and man. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 86, p. 1797-1804, 2006.

FREITAS, D.F.; VALLE, A.C.; ALMEIDA, P.R.; BASTOS, F.I.; GALHARDO, M.C. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. **Clin Infect Disease**, v. 50, p. 453, 2010.

FRIDMAN, E., WANG, J., IJIMA, Y., FROEHLICH, J.E., GANG, D.R., OHLROGGE, J., PICHERSKY, E. Metabolic, genomic and biochemical analyses of glandular trichome from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the methylketone biosynthetic pathway. **Plant Cell**, v. 17, p. 1252-1267, 2005.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**. v. 177, p. 39-54, 2002.

FURTADO, T.; ARMOND, S. Esporotricose ocupacional e familiar, **Med. Cut. I.L.A.**, Rio de Janeiro , v. 9 (3), p. 207-210, 1981.

GHANNOUM, A.A.; RICE, B.L. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, p. 501–517, 1999.

GARCÍA, M.D. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.69-73, 2004.

GIADA, M.L.R. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada**. São Paulo, 2006. 206p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; PORTUGAL, H. Potentiation of Antifungal Activity of Amphotericin B by Essential Oil from *Cinnamomum cassia*. **Phytotherapy Research**. v. 20, p. 58-61, 2006.

GIORDANI, C.; GUTERRES, K.A.; MATOS, C.B.; SILVA, C.C.; FARIA, R.O.; CLEFF, M.B. , 2014. Ação dos extratos hidroalcoólicos de aroeira-mansa e lanceta

frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis*, resumo publicado em XVI Encontro de Pós-Graduação UFPel, 2014, Pelotas. **XVI Encontro de Pós-Graduação UFPel, 2014.**

GRAY, K.C; PALACIOS, D.S; DAILEY, I; ENDO, M.M; UNO, B.E; WILCOCK, B.C; BURKE, M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012.

GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; GOLDSTONE, F.J.; BRYAN, S.E.; PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. V. 53(Suppl 1), p. 110-8, 2004.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**; v. 23(suppl 1), p. 118-26, 1993.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of Brazilian fruits, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of food composition and analysis**, v.22, p.394-396, 2009.

HEIDRICH, D.; STOPIGLIA, C.D.O.; SENTER, L.; VETORATTO, G.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M.L.; Successful treatment of terbinafine in a case of sporotrichosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. V. 86(Supl1) p.182-185, 2011.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; ANZAWA, K. MOCHIZUKI, T.; CHAKRABARTI, A; UNGPAKORN, R. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**. V. 50, p.19-26, 2009.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. V. 46, p. 120-128, 2008.

KAUFFMAN, C.A.; HAJJCH, R.; CHAPMAN, S.W. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis for the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America, **Clinical Infection Disease**, Chicago, v. 30, p. 684-687, 2000.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, O. Sporotrichosis in farmers, **Journal of UOEH**, Tokio, v.24, n.2, p.219-224, 2002.

KOHLER, L.M.; MONTEIRO, P.C.F.;HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. In Vitro Susceptibilities of Isolates of *Sporothrix schenckii* to Itraconazole and Terbinafine. **Journal Clin Microbiol**. V. 42(9), p. 4319–4320, 2004.

KONG, X.; XIAO T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.12, p.1077–1081, 2006.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, Ed: Savier, São Paulo, 9a ed., p. 479-497, 2002.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p.508-36, 1997.

LARSSON, C.E. Esporotricose. **Brazilian Jounal Vet. Res. Anim. Sci.**, Sao Paulo, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LEE, L.S.; BROOKS, L.O.; HOMER, L.E.; ROSETTO, M.; HENRY, R.J. & BAVERSTOCK, P.R. Geographic variation in the essential oils and morphology of natural populations of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.343-360, 2002.

LEMON, J.A.; ROLLO, C.D.; BOREHAM, D.R. Elevated DNA damage in a mouse model of oxidative stress: impacts of ionizing radiation and a protective dietary supplement. **Mutagenesis**. V. 23(6), p. 473-82, 2008.

LIMA, M.E.L. et al., Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Two Specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) Native from São Paulo State – Brazil, **Pharmacologyonline**, 3, p. 589-593, 2006.

LIMA, O.C.; FIGUEIREDO, C.C.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L.L. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infection and Immunity**, v.69, n.1, p.6874-6880, 2001.

LIPP, H.P. Antifungal drugs clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Mycoses** 51: 7-18. 2008.

LOEPER, J. et al. Hepatotoxicity of germander in mice. **Gastroenterology**, v. 106, p. 464-72, 1994.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Esporotricose no Rio Grande do Sul. Três décadas de observação. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. V. 64, p. 307-310, 1989.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.293- 308, 2006.

MACHADO, J. A. C.; ROCHA, J. R.; SANTOS, L. M.; OLIVEIRA, A. C.; ANTÔNIO, N. S.; CANESIN, R.; PEREIRA, R. E. P. Principais agentes etiológicos causadores de micoses cutâneas em equinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008.

MADRID, H.; GENE, J.; CANO, J.; SILVEIRA, C.; GUARRO, J.; *Sporothrix*

brunneoviolacea and *Sporothrix dimorphospora*, two new members of the *Ophiostoma stenoceras Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**. V. 102, p. 1193–1203, 2010.

MADRID, Isabel Martins. **Estudo das características fenotípicas, fatores de patogenicidade e suscetibilidade de isolados de *Sporothrix schenckii* frente a desinfetantes**. 113f. Tese (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, 2011.

MAGAGNIN, C. M.; STOPIGLIA, C. D. O.; VIEIRA, F. J.; LAMB, F. M.; STOPIGLIA, C. D. E.; HEIDRICH, D.; VETORATO, G.; SCROFERNEKER, M. L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 694-701, 2011.

MAHAJAN, V.K. Hindawi Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Publishing Corporation Dermatology Research and Practice**. Review Article, Article ID 272376, 13 pages, Volume 2014.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M., et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal Clinical Microbiol.** V.45, p. 3198–3206, 2007.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENE, J.; CANO, J., GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, p. 732–734, 2008.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU, M.; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxido-eugenol. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, p. 729-737, 1992.

MARQUES, O.C.P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante**. 2008. 210p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2008.

MARTINEZ, E.Z. **Perfil epidemiológico, clínico e terapêutico da Esporotricose no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, no período de 2002 a 2004** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2006.

MARTINS, Anelise Afonso. Esporotricose sistêmica experimental: avaliação in vitro da $\beta(1-3)$ glucana e em associação ao itraconazol em modelo murino. 2012. 119f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M.B.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; SCHUCH, L.F.D.; ANTUNES, T.A.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.1, p.105-109, 2007.

MEINERZ, A.R.M; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; CLEFF, M.B. *In vitro* susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40(1), p.60-62, jan-fev, 2007.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; CINTIA, S.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, Massachusetts, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

MILLEZI, A.F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 112p. (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MORRIS-JONES R. Sporotrichosis. **Clinical Dermatology**, v.27, p. 427-431, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAMURA, Y.; SATO, H.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; KOIDE, K.; HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan, **Mycosis**, Tokyo, v. 39, n. 3-4, p. 125-128, 1996.

NAKAOKA-SAKITA, M.; AGUIAR, O. T.; YATAGAI, M.; IGARASHI, T. "Óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) I: cromatografia a gás/espectrometria de massa (CC/EM)," **A Revista do Instituto Florestal**, vol. 6, pp. 53-61, 1994.

NOBRE, M. O. **Avaliação da virulência de diferentes cepas de *Sporothrix schenckii***. 2004. 77p. Tese (Doutorado) Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, p. 257- 67, 2011.

OROFINO-COSTA, R.; UNTERSTELL, N.; GRIPP, C. A.; MACEDO, P.M.; BROTA, A.; DIAS, E.; et al. Pulmonary cavitation and skin lesions mimicking tuberculosis in a HIV negative patient caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology Case Report**. v.2, p. 65-71, 2013.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v.73, p.236-44, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-20,

2007.

PAULA, J. A. M. et al., Estudo Farmacognóstico das Folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (GOMES) L. R. Landrum – Myrtaceae, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2 (2), p.153-156, 2005.

PAULA, J.A.M. et al., Estudo Farmacognóstico da Casca de *Pimenta pseudocaryophyllus* (GOMES) L. R. Landrum – Myrtaceae, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3 (2), p.1-3, 2006.

PAULA, J. A. M., DE PAULA, J. R.; PIMENTA, F. C.; REZENDE, M. H.; FREITAS, M. T. "Antimicrobial activity of the crude ethanol extract from *Pimenta pseudocaryophyllus*," **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 10, p. 987–993, 2009.

PAULA, J.A.M.; REIS, J.B.; FERREIRA, L.H.M.; MENEZES, A.C.S.; PAULA, J.R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p. 363-379, 2010.

PAULA, J.A.M., et al. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 2011.

PAULA, J.A.M. Silva, M.R.R., M.P. Costa, D.G.A. Diniz, F.A.S. Sá, S.F. Alves, E.A. Costa, R.C. Lino, J.R. Paula, Phytochemical Analysis and Antimicrobial, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae), **Evid-Based Compl. Alt.**, 15 pages, 2012.

PAPPAS, P.; TELLEZ, I.; DEEP, A.; NOLASCO, D.; HOLGADO, H.; BUSTAMANTE. Sporotrichosis in Peru: description of na arca of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 65-70, 2000.

PEIXOTO SOBRINHO, S.J.T. et al. OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES DE *Bauhinia cheilantha* (BONGARD) STEUDEL. **Química Nova**, V. 33, N. 2, p. 288-291, 2010.

PERRY, N.B.; ANDERSON, R.E.; BRENNAN, N.J.; DOUGLAS, M.H.; HEANEY, A.J.; MCGIMPSEY, J.A. & SMALLFIELD, B.M. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plant parts, seasons and sites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.47, p. 2048-2054, 1999.

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa Phytopathol**, v.36, n.1, p. 85-88, 2010.

Portaria MS/GM no 533, de 28 de março de 2012, que estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília, Ministério da Saúde, 2012.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R.J. Rang & Dale Pharmacology (6th ed.). Fármacos Antifúngicos. **Churchill Livingstone: Elsevier**,

2007.

RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVEDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, p. 141- 147, 2005.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Efeito inibitório de óleos de tomilho sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 14, n. 6, p. 479-83, 2004.

RIBEIRO, JOELKSON DINIZ. Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica Lindl.* Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química, 2009.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 31-53, 2003.

RODRIGUES, A.M.; HOOG, S.; CAMARGO, Z.P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology** 51: 405–412, 2013.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 2013.

RODRIGUES, A.M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Negl Tropical Disease** v.7, p. 2281, 2013.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA. 180 p, 2001.

RODRIGUES et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v.14, p. 219, 2014.

ROMANI, L.; FRANCESCO, B.; PUC CETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v.10, p.508-514, 2002.

ROMERO, C.D. et al. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.253-7, 2005.

ROSA, A. C. M.; SCROFERNEKER, M. L.; VETTORATO, R., GERVINI, R. L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p.451-459,

2005.

ROTHENSTEIN, A.S.; BOOMAN, K.A.; DORSKY, J.; KOHRMAN, K.A. Eugenol and clove leaf oil. A survey of consumer patch-test sensitization. **Food Chem Toxicol** v. 21, p. 727-733, 1983.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p. 996-1002, 2010.

SAENZ, M.T. et al. Antibacterial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*. **Fitoterapia**, v.75, p. 599-602, 2004

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.4, p.1212-1220, 2007.

SAKITA, M.N.; AGUIAR, O.T.; YATAGAI, M.; IGARASHI, T. Óleo essencial de *P. Pseudocaryophyllus* var. *Pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) cromatografia a gás/ espectrometria de massas (CG/EM). **Revista do Instituto Florestal**, v. 6, p 53-61, 1994.

SAMALAIA, M. O.; ABDULLAHI, K. Cutaneous manifestations of deep mycosis: an experience in a tropical pathology laboratory. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 282-286, 2011.

SAMPAIO, S.A.P.; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. Micoses profundas in: **Dermatologia**, 2 ed., São Paulo, São Paulo: Artes Médicas, p.535-561, 2000.

SAMY, J.; SUGUMARAM, M.; LEE, K. **Herbs of Malaysia**. Ed. K.M. Wong, Pub. Times Editions - Marshall Cavendish, p. 244, 2005.

SANTOS, L. P. B. **Avaliação de compostos com potencial antifúngico em *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis***. 2012. 141f. Dissertação de Mestrado [(Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SAZAKI, A.A. et al. Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. **PLOS ONE**, 2014.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem e o desenvolvimento de medicamentos. In: **SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, p. 499-526, 2002.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis**. V. 21(2), p.129–33, 2008.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.L.; YAMADA,

K.; ZAITZ, C.; FRAMIL, V.M.S.; MURAMATU, L.H. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide a 24 year experience in Sao Paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** V. 53(2), p. 89-93, 2011.

SCORZONI, L.; BENADUCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.38, p. 391-397, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004. 388p.

SILVA, M.B.T. **Distribuição socioespacial da esporotricose humana de pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, no período de 1997 a 2007, residentes no Estado do Rio de Janeiro** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz; 2010.

SILVEIRA, C.P.; Josep M. TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; GONZALO, F.M. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology.** v. 58, p. 1607–1610, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. **7a ed. Rio de Janeiro: LTC**, 490p., 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis.** In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; et al. Rio Grande do Sul: Editora da UFRS, 5 ed., p. 467-495, 2004.

SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; MEIRELES, M.C.A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.372-374, 2006.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.** 640p, 2005.

STOCKERT, J.C.; CASTRO, A.B.; CANETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.

STOPIGLIA, C. D. O.; VIANNA, D. R.; MEIRELLES, G. C.; TEIXEIRA, H.; VON POSER, G. L.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 21, p.169-172, 2011.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T.; **Química Nova**, 32, 1189, 2009.

TASLEEM, A.J.D et al., Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**. V. 11, N. 7, p. 621–638, July 2009.

TATEISHI, T.; MURAYAMA, S.Y.; OTSUKA, F.; YAMAGUCHI, H. Karyotyping by PFGE of clinical isolates of *Sporothrix schenckii*. **Immunology Medical Microbiology**. v. 13: p.147-54, 1996.

TEIXEIRA, P. A., CASTRO, R. A., NASCIMENTO, R. C., TRONCHIN, G., PEREZ-TORRES, A, LAZÉRA, M., ALMEIDA, S. R., BOUCHARA, J. P., LOUREIRO Y PENHA, C. V., AND LOPES-BEZERRA, L. M. (2009). Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology** v. 155, p. 3730–3738, 2009.

THOMSON, G.E. Further consideration of Asian medicinal plants in treating common chronic diseases in the West. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 4, p. 125-130, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 964p, 2011.

TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J.; LANDRUM, L.R. Volatile leaf oils of Caribbean Myrtaceae. II. *Pimenta dioica* (L.) Merr. of Jamaica. **Journal of Essential Oil Research**, v.3, p.195-6, 1991.

VASQUEZ-DEL-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PADILLA-DESGARENES, C. Sporotrichosis. **Clinical Dermatology**. V.30, p. 437–443, 2012.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERGARA, M.L.; CAMARGO, Z.P.; SILVA, P.F.; ABDALLA, M.R.; SGARBIERI, R.N. et al. Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. **Am J Trop Med Hyg**. v. 86, p. 477–480, 2012.

WANKE, B.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S. Classificação e características gerais dos fungos patogênicos para o homem. In: COURA, J.R. (Org.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1137- 1142p, 2005.

WHO. General guidelines for methodologies on research and evaluation of Traditional Medicine. **World Health Organisation**, Geneva 2001.

WRIGHT, D.E.; WHITE, F.A.; GERFEN, R.W.; SILOS-SANTIAGO, I.; SNIDER, W.D. The guidance molecule semaphoring III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. **Journal of Compartmental Neurology**, v. 361, p. 321-333, 1995.

WRIGHT, S.E.; BARON, D.A.; HEFFNER, J.E. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. **Journal Lab Clin**

Med v. 125, p. 257-264, 1995.

WU, B. N.; HWANG, T. L.; LIAO, C. F.; CHEN, M. I. J. Vanimolol: a new selective beta B-adrenergic antagonist derived from vanillin. *Biochemical Pharmacology*, v. 48, p. 101-109, 1994.

YOSHIIKE, T.; PENG-CHENG, L.; KOMATSUZAKI, H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* inoculated hairless mice. ***Mycopathologia***, v.123, p. 69-73, 1993.

YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. ***Toxicology***. v. 268, p. 204-212, 2010

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve histórico da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Eds.). ***Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna***. Chapecó: Argos. p.17-44, 2001.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A.M.; FENG, P.; HOOG, G.S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. ***Fungal Divers***: p.1–13, 2013.